

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO

**“UTILIDAD DE LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE INFECCIONES PARASITARIAS EN
ÉQUIDOS”**

RUBÉN FRANCISCO VÁZQUEZ

Lugo, abril de 2013



Los profesores del Departamento de Patoloxía Animal (Área de Sanidade Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo) de la Universidade de Santiago de Compostela, Doña María Sol Arias Vázquez, Doña Rita Sánchez-Andrade Fernández y D. Adolfo Paz Silva,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“UTILIDAD DE LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES PARASITARIAS EN EQUINOS”**, que presenta el Licenciado con Grado en Veterinaria D. RUBÉN FRANCISCO VÁZQUEZ para optar al Título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 3 de abril de 2013.

María Sol Arias Vázquez

Rita Sánchez-Andrade Fernández

Adolfo Paz Silva

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han participado en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

A mis directores, que han sido mucho más que eso, Profesores Doctores María Sol Arias Vázquez, Rita Sánchez-Andrade Fernández y Adolfo Paz Silva por haberme propuesto un tema de Tesis tan acorde con mis preferencias y guiarme en la realización de este trabajo. A los tres, muchas gracias por vuestra inestimable ayuda, ánimo, paciencia y amistad.

A los Catedráticos del Departamento de Patología Animal, Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo y Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por darme la oportunidad de formar parte de este extraordinario grupo de investigación.

Al Dr. José Luis Suárez García de Paredes, y al Dr. Iván Francisco Vázquez, sin su colaboración hubiese resultado imposible llevar a cabo esta tarea.

A los Dres. Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez, Ángel Romasanta Blanco, Pablo Díaz Fernández, por su disponibilidad y colaboración.

A los doctorandos Pablo Piñeiro, Javier Cortiñas, Cristiana, Silvia, Isa, Jaime, Rodrigo y Fabián, compañeros de faena con los que he pasado momentos muy agradables durante la realización de esta Tesis.

A la nueva hornada, Andreu, María, Diego y Jose (Malagón), por el apoyo mostrado, y por entender que el ambiente es imprescindible para que las tareas lleguen a feliz término.

A mi familia: a mis abuelos Feliciano y Carmen, a mi tío Feliciano, a mis padrinos Ramón y Marisa, por comprenderme (tarea difícil en ocasiones) y apoyarme.

En especial me gustaría dedicar esta memoria a mis padres Ramón y Eva, y a mis hermanos Iván y Efrén, por animarme y quererme, para que nunca pierdan la fuerza y la ilusión.

A todos MUCHAS GRACIAS

Financiación

El presente Trabajo ha sido posible gracias a la financiación y colaboración de los organismos públicos y privados que se detallan a continuación:

Proyectos de Investigación

“Incorporación de hongos parasitoides autóctonos a piensos comerciales para prevenir la Infección de animales de renta”, Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015).

“Desarrollo de ganadería ecológica: de la sostenibilidad a la inclusión social”, Consellería de Economía e Industria, Xunta de Galicia (2010-2012).

“Estrategias de control biológico de los parásitos del caballo salvaje para la gestión sostenible de la biomasa en el monte gallego”, Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (2007-2010).

“Estudio de las principales parasitosis del caballo gallego”, Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (2006-2007).

Contratos de Investigación

“Estudo das principais parasitoses do cabalo de pura raza galega”, Asociación de Criadores de Cabalos Pura Raza Galega (PURAGA, Muras, Lugo) (2007-2008).

“Principales parasitosis del caballo en extensivo”, Laboratorios Karizoo S.A. P.I. (Barcelona) (2008).

“Estudio de las posibilidades de control de enfermedades parasitarias en caballos de Galicia”, PFIZER, S.A. (Madrid) (2008).

“Estudio do estado sanitario do cabalo Pura Raza Galega: efecto das parasitoses na reprodución”, A. y C. MARPU S.L. (A Coruña).

"Aplicación de técnicas de proteómica a la investigación en Parasitología veterinaria", CELTA INGENIEROS (A Coruña) (2008-2010).

"Asesoramiento en el control de parasitosis en caballos mantenidos en extensivo en la comarca de la Cerdanya (Cataluña)", Joves Agricultors i Ramaders de Catalunya (JARC) (2009-2010).

Publicaciones

La actividad desarrollada para la realización de este estudio se ha plasmado en diversas publicaciones:

En revistas indexadas

ARIAS, M.S., FRANCISCO, I., SANCHÍS, J., PIÑEIRO, P., CAZAPAL-MONTEIRO, C., CORTIÑAS, F.J., SUÁREZ, J.L., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2013). Treatment of dairy cattle naturally infected by Paramphistomidae (*Calicophoron daubneyi*) gastric flukes. *Veterinary Parasitology* (en prensa)

ARIAS, M., YEARGAN, M., FRANCISCO, I., DANGOUDOUBIYAM, S., BECERRA, P., FRANCISCO, R., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., HOWE, D.K. (2012). Exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigen. *Veterinary Parasitology*, 185: 301-304.

ARIAS, M.S., PIÑEIRO, P., HILLYER, G.V., FRANCISCO, I., CAZAPAL-MONTEIRO, C.F., SUÁREZ, J.L., MORRONGO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2012). Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. *Parasitology Research*, 110: 1001-1007.

PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, R., RODRÍGUEZ, I., FRANCISCO, I., CAZAPAL-MONTEIRO, C.F., ARIAS, M.S., SUÁREZ, J.L., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2011). Isolation of potentially useful antigens from cyathostomin third-stage larvae by using a fast protein liquid chromatography one-step method. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18: 1462-1466.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M.S., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2011). Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. **Journal of Equine Veterinary Science**, 31: 530-535.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., MULA, P., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., SCALA, A., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A. (2010). A novel 2nd instars-*Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. Guidelines to an accurate chemotherapy. **Veterinary Parasitology**, 171: 314-320.

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J., MULA, P., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., VÁZQUEZ, L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., DÍEZ-BAÑOS, P., SCALA, A., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2010). Analysis of the IgG-antibody response against *Gasterophilus intestinalis* in silvopasturing horses from NW Spain as a contribution to the chronobiology of this myiasis. **Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología**, 69: 66-71.

FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., SÁNCHEZ, J.A., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., URIARTE, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2009). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock. Analysis of the infection by endoparasites. **Veterinary Parasitology**, 164: 357-362.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., ARIAS, M., MULA, P., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. **Equine Veterinary Journal**, 41: 713-715.

En revistas no indexadas

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J., SÁNCHEZ, J.A., DACAL, V., ARAÚJO, A.M., FRANCISCO, R., CAZAPAL-MONTEIRO, C., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-

ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Sensibilización de caballos del noroeste de España frente a antígenos de *Gasterophilus* spp. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J., FRANCISCO, R., CAZAPAL-MONTEIRO, C., ARIAS, M., PIÑEIRO, P., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Encuesta sobre el control parasitario de equinos de Pura Raza en Galicia. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra.

SÁNCHEZ, J.A., ARIAS, M., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., VÁZQUEZ, L., CAZAPAL-MONTEIRO, C., SUÁREZ, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Utilización del hongo atrapa-nematodos *Duddingtonia flagrans* para fomentar la sostenibilidad del ganado equino en minifundio. **Libro de Actas del II Congreso Nacional de Zootecnia**: 184-186.

ARIAS, M., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., CORTIÑAS, F.J., DACAL, V., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., SÁNCHEZ, J.A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Producción ecológica de carne: prevención de la parasitación mediante el empleo del hongo atrapa-nematodos *Duddingtonia flagrans*. **Libro de Actas del II Congreso Nacional de Zootecnia**: 154-156.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., DACAL, V., VÁZQUEZ, L., PATO, F.J., SUÁREZ, J., CASARIEGO, I., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., RIGUEIRO, A., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2010). Aliado de la naturaleza: Équidos y sostenibilidad. **Ecuestre**, 323: 14-17.

FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., DACAL, V., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., VALERO, R., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., SUÁREZ, J., CASARIEGO, I., MENDOZA DE GIVES, P., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Investigación sobre métodos naturales preventivos: Lucha anti-parásitos. **Ecuestre**, 322: 30-32.

FRANCISCO, I., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., DACAL, V., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., DÍEZ-BAÑOS, P., VALERO, R., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., MENDOZA DE GIVES, P., PAZ-SILVA, A. (2009). Control parasitario y sostenibilidad: efecto de la carga parasitaria

(ciatostómidos) sobre la eficacia *in vitro* del hongo *Duddingtonia flagrans*. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra: 151-154.

CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., ARIAS, M., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J.L., MOCHALES, E., VÁZQUEZ, L., MULA, P., SCALA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Control de miasis y ectoparasitosis en caballos en silvopastoreo. **Información Técnica Económica Agraria (ITEA)**, Volumen: Extra (29): 45-48.

FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., MULA, P., SUÁREZ, J.L., PRADO, J., URIARTE, J., DÍEZ-BAÑOS, P., SÁNCHEZ, J.A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Epidemiología de las infecciones por estróngilos en équidos en sistemas de producción extensiva de Galicia: periodos de riesgo. **Información Técnica Económica Agraria (ITEA)**, Volumen: Extra (29): 53-57.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., ARIAS, M., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., FRANCISCO, R., DÍAZ, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2009). Dificultades en la interpretación de la relación parasitación-hematología en caballos en pastoreo. **Medicina y Cirugía Equina**, Volumen Extra: 145-149.

FRANCISCO, I., POSE, H., SÁNCHEZ, J., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., PAINCEIRA, A., CORTIÑAS, F.J., DACAL, V., VÁZQUEZ, L., FRANCISCO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2008). Consideraciones sobre la importancia de los principales parásitos digestivos del caballo en Galicia. **Xóvenes agricultores**, maio-xuño: 37- 45.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, J., DACAL, V., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2007). Nuevas perspectivas de control parasitario en caballos salvajes: Pura Raza Galega. **Situación actual y futuro de las razas puras**, Volumen Extra: 124.

FRANCISCO, I., ARIAS, M.S., SUÁREZ, J.L., PAINCEIRA, A., CORTIÑAS, J., DÍAZ, P., MORRONDO, P., SANMARTÍN, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2007). Sostenibilidad del caballo pura

raza galega: estudio parasitológico. **Situación actual y futuro de las razas puras**, Volumen Extra: 123.

ARIAS, M.S., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., PAINCEIRA, A., CORTIÑAS, J., DÍAZ, P., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2007). Análisis de riesgo de infección por nematodos gastrointestinales en el caballo gallego. **Medicina y Cirugía equina**, Volumen Extra: 215-220.

SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, I., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, J., DACAL, V., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2007). Evaluación de la eficacia de un tratamiento antiparasitario en caballos salvajes. **Medicina y Cirugía equina**, Volumen Extra: 221-224.

Capítulos de Libro

M. ARIAS, J. SUÁREZ, F.J. CORTIÑAS, I. FRANCISCO, J.L. SUÁREZ, A. ROMASANTA, C. CAZAPAL-MONTEIRO, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, A. PAZ-SILVA. (2012). Restoration of fungal biota in the soil is essential to prevent infection by endoparasites in grazing animals. En: **Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease**. Editores: **ADOLFO PAZ-SILVA & MARÍA SOL ARIAS VÁZQUEZ**. Nova Science Publishers, Hauppauge NY (USA), pp. 341-358. ISBN: 978-1-61942-671-9.

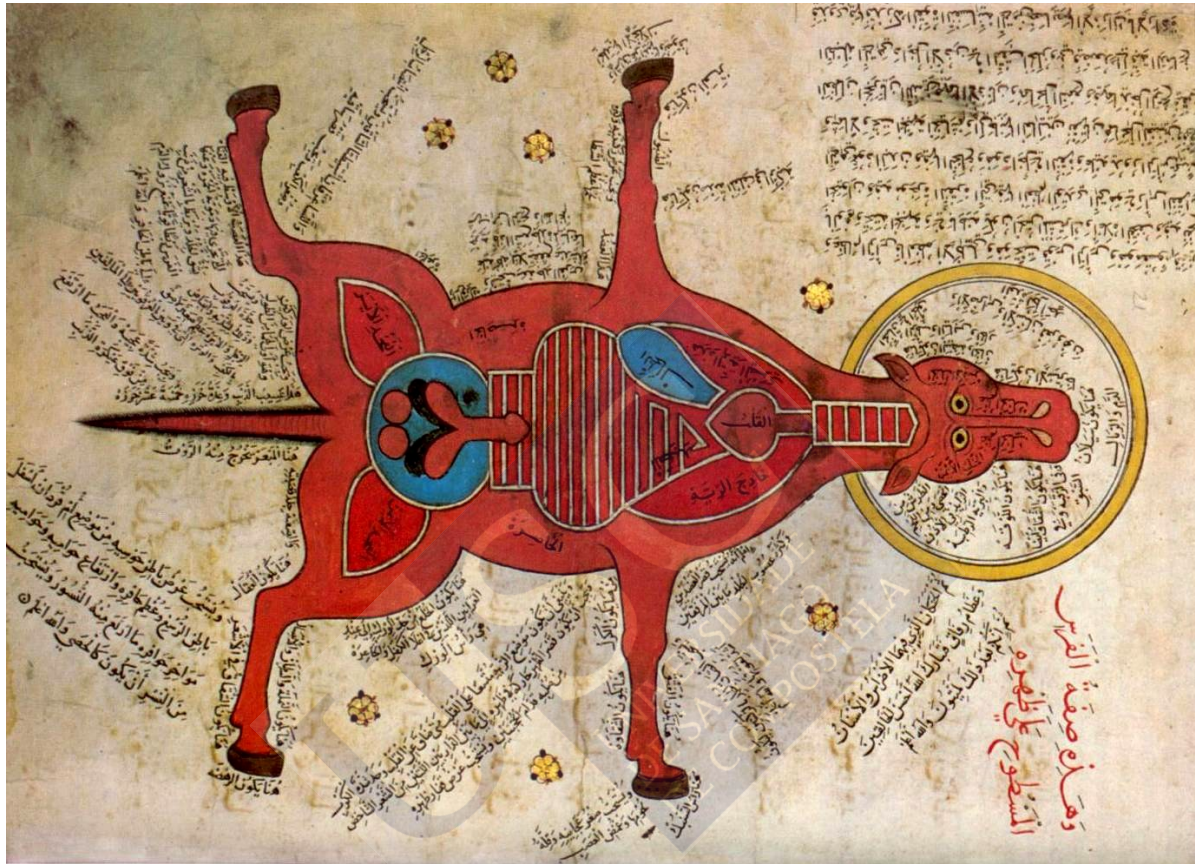
M. ARIAS, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, J.L. SUÁREZ, P. PIÑEIRO, R. FRANCISCO, C. CAZAPAL-MONTEIRO, F.J. CORTIÑAS, I. FRANCISCO, A. ROMASANTA, A. PAZ-SILVA. (2011). Parasitic diseases in livestock under different types of grazing management. Diagnosis and possibilities for their control. En: **Livestock: Rearing, Farming Practices and Diseases**. Editor: **TARIQ JAVED**. Nova Science Publishers, Hauppauge NY (USA), pp. 105-126. ISBN: 978-1-62100-181-2.

A. PAZ-SILVA, M. ARIAS, I. FRANCISCO, F.J. CORTIÑAS, R. FRANCISCO, E. MOCHALES, J.L. SUÁREZ, P. DÍEZ-BAÑOS, P. MORRONDO, R. SÁNCHEZ-ANDRADE. (2010). Cross-immunity and interpretation of the diagnostics of parasitic trematodosis in ruminants by means of immunoenzymatic probes. En: **Veterinary Parasitology**. Editor: **McADAM**. Nova Science Publishers, Hauppauge NY (USA), pp. 271-288. ISBN: 978-1-60741-631-9.

ÍNDICE

	Pág
1. ANTECEDENTES	1
1.1.- PRINCIPALES PARASITISMOS DEL GANADO EQUINO	5
1.2.- DIAGNÓSTICO DE PARASITISMOS DEL GANADO EQUINO	6
1.2.1. Principales técnicas de diagnóstico parasitológico en équidos	8
1.2.2. Inconvenientes que plantean las principales técnicas de diagnóstico parasitológico en équidos	13
1.3.- DIAGNÓSTICO MEDIANTE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	16
1.4.- DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO	17
1.4.1. Antígenos parasitarios	18
1.4.2. Pruebas serológicas: enzimoimmunoensayo (ELISA)	22
1.4.3. Pruebas serológicas: inmunoelectrotransferencia (EITB)	23
1.4.4. Determinación del punto de corte	24
1.4.5. Ventajas del empleo de técnicas serológicas de inmunodiagnóstico	28
1.4.6. Fiabilidad y exactitud de las técnicas inmunoenzimáticas	30
1.4.7. Problemática de la aplicación de las técnicas inmunológicas	32
1.5.- APLICACIÓN DE PRUEBAS INMUNOLÓGICAS AL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES PARASITARIAS EQUINAS	34
2. UNIDAD TEMÁTICA	39
Objetivos	45
3. PUBLICACIONES	47
3.1. Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under an oceanic climate area (NW Spain)	49
3.2. A novel 2 nd instars <i>Gasterophilus</i> excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses.	57
3.3. Isolation of potentially useful antigens from cyathostomin third-stage larvae by using a fast protein liquid chromatography one-step method.	67
3.4. Exposure to <i>Sarcocystis</i> spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using <i>Sarcocystis neurona</i> merozoites as heterologous antigen	75
4. RESUMEN Y DISCUSIÓN	81
5. CONCLUSIONES	91
6. BIBLIOGRAFÍA	95





1. Antecedentes



Los caballos experimentan infecciones provocadas por diferentes parásitos, entre los que cabe destacar, por su elevada frecuencia de aparición, artrópodos, cestodos y nematodos gastrointestinales. La etiología de los parasitismos equinos guarda relación con el hábitat y las condiciones de manejo de los animales, estableciéndose que en pastoreo existe mayor riesgo de infección por nematodos y cestodos (Madeira et al., 2003; Kjaer et al., 2007; Arias et al., 2011). Sin embargo, es preciso señalar que incluso los caballos de alto valor económico, que suelen permanecer prácticamente reclusos en boxes todo el día, también tienen oportunidad de ingerir pasto cuando pasean, o sufrir el acoso de las moscas de *Gasterophilus* cuando participan en concursos, reuniones equinas, etc. (Francisco, 2010).

El control de los parasitismos en caballos, al igual que sucede en el resto de especies animales, se basa en la correcta detección de los agentes etiológicos. Pese a que el diagnóstico de algunas helmintosis no entraña dificultad cuando se aplican técnicas coprológicas, se debe tener en cuenta que no todas las parasitosis cursan con la eliminación de huevos o larvas en las heces, de ahí que estas técnicas no resulten útiles.

Por este motivo, algunas infecciones parasitarias no llegan a ser diagnosticadas y pasan desapercibidas. En otras situaciones, la resolución del caso suele implicar la administración indiscriminada de diversos antiparasitarios.

La observación de huevos de parásitos en las heces conlleva la presencia de formas sexualmente maduras en los caballos. Uno de los inconvenientes que surgen del examen de muestras fecales es que ha de transcurrir un periodo de tiempo entre la infección de los animales y el desarrollo de las formas parasitarias hasta estadios adultos, que se denomina *periodo de prepatencia*, durante el cual tienen lugar las alteraciones patológicas más importantes en los caballos, de ahí que el resultado sea *tardío*.

Aunque se indican técnicas coprológicas como la flotación para el diagnóstico de las cestodosis equinas (*Anoplocephala* spp.), la observación de huevos en las heces no resulta siempre tarea fácil, posiblemente porque estos parásitos están constituidos por segmentos o proglotis, que conforme van madurando en su desarrollo tienen un número elevado de huevos en los

segmentos finales, que se desprenden y salen al exterior con las heces. Debido a que los huevos no suelen abandonar los proglotis, su detección mediante flotación es difícil (Abbott y Barrett, 2008).

Otro aspecto a tener en cuenta sería la fertilidad de los parásitos hembra en aquellas especies que presentan dimorfismo sexual, porque también podría influir en la producción de huevos y con ello en su posible observación en las heces.

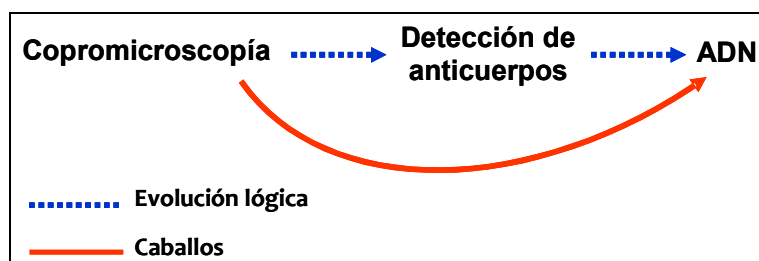
Se han aplicado diferentes técnicas para mejorar los resultados de los análisis coprológicos, aunque es importante destacar que al contrario de lo que sucede en otras especies animales, el diagnóstico por necropsia continúa gozando de un elevado predicamento entre los parasitólogos dedicados al ganado equino.

En los últimos años se han desarrollado y puesto a punto diversos procedimientos basados en la detección de anticuerpos frente a antígenos parasitarios, mediante técnicas inmunoenzimáticas, y su aplicación aumenta aunque de forma muy lenta (Getachew *et al.*, 2012). Como se desgranará más adelante, no existe un número elevado de investigaciones en este ámbito, ni en las posibilidades de poner en evidencia anticuerpos específicos, ni tampoco en la obtención y purificación de antígenos de utilidad.

El análisis de ácidos nucleicos con técnicas basadas en la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de parasitismos equinos (Traversa *et al.*, 2008), pero hay que reconocer que su complejidad y coste frenan notablemente su utilización rutinaria.

Resulta paradójico que en el diagnóstico de parasitosis equinas se ha producido (a nuestro juicio) una evolución excesivamente rápida de la aplicación de técnicas copromicroscópicas a las de detección de ácidos nucleicos, sin comprobar la utilidad de procedimientos inmunoenzimáticos para analizar la presencia de anticuerpos, al contrario de lo ocurrido en otras especies animales. Basta hacer una búsqueda en una base de datos como **Pubmed** para fundamentar este razonamiento. Con las palabras clave *horse parasite egg* se encuentran 450 referencias, por 157 si se emplean *horse parasite DNA* y tan sólo 85 al introducir *horse parasite ELISA*.

Es interesante destacar que el *leitmotiv* de la **21 Conferencia Internacional de la Asociación para el desarrollo de la Parasitología Veterinaria** (WAAVP, *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*) celebrada en Gante (Bélgica) en agosto de 2007 fue precisamente *Del recuento de huevos por gramo de heces a los genes*, que dibuja con claridad el aspecto actual del diagnóstico parasitario en caballos.



Sin poner en duda la gran utilidad de las técnicas de base genético-molecular, la evolución observada en el diagnóstico de infecciones parasitarias en caballos parece reflejar un cambio en el enfoque veterinario de estos problemas, pasando de considerar los animales como parte de un grupo (rebaños en pastoreo, sistemas de producción intensiva) hacia una medicina más individual, probablemente porque en ocasiones el veterinario ha alcanzado el estatus de especialista de animales de alto valor económico o sentimental. En este marco cobra sentido que se desarrollen procedimientos para la identificación de ADN de parásitos, aunque su coste limite actualmente su aplicación rutinaria.

1.1.- PRINCIPALES PARASITISMOS DEL GANADO EQUINO

En la tabla siguiente se recogen los parasitismos descritos en los caballos, de acuerdo con los grandes grupos definidos. Como se puede comprobar, la mayoría de las infecciones se detectan mediante diferentes técnicas copromicroscópicas. El diagnóstico fundamentado *casi en exclusiva* en la observación de materia fecal reduce la detección de posibles parasitismos a aquellos provocados por agentes que afectan al aparato digestivo o al respiratorio. Este inconveniente se podría solucionar con el empleo de técnicas de diagnóstico de diferente naturaleza.

Grupo	Agente	Muestra	Diagnóstico
Protozoos	<i>Eimeria</i> spp.	Heces	Coprológico: Flotación
Protozoos	<i>Babesia</i> <i>Theileria</i>	Sangre	Extensión sanguínea
Trematodos	<i>Fasciola hepatica</i> <i>Dicrocoelium</i> spp	Heces	Coprológico: Sedimentación
Cestodos	<i>Anoplocephala</i> spp <i>Paranoplocephala</i> spp	Heces	Coprológico: Flotación
Nematodos	<i>Parascaris</i> spp	Heces	Coprológico: Flotación
	Estrongilados	Heces	Coprológico: Flotación
	<i>Dictyocaulus arnfieldi</i>	Heces	Coprológico: Migración
Artrópodos	Ixódidos Ácaros de la sarna Dípteros causantes de miasis	Piel, costras	Examen directo Necropsia

1.2.- DIAGNÓSTICO DE PARASITISMOS DEL GANADO EQUINO

La lucha frente a las enfermedades parasitarias incluye un conjunto de medidas: conocerlos (diagnóstico), eliminarlos (erradicación) o reducirlos a un nivel compatible con la sanidad y la economía (control).

El diagnóstico de la enfermedad parasitaria se debe realizar previa conjunción de diversas técnicas entre las que cabe destacar la anamnesis o análisis de los antecedentes, las pruebas de laboratorio, y en aquellos casos en que sea posible, el estudio sobre el cadáver.

Como indica su nombre, la **anamnesis** (del griego *αναμνησις*, traer a la memoria) consiste en la indagación del número de animales afectados, momento en que se produjo el primer caso, antecedentes sanitarios de la explotación, tipo de alimentación, tratamientos aplicados, etc. Sin embargo, las manifestaciones del informante deben ser tomadas con ciertas reservas, sobre todo cuando sean dadas por el propietario o cuidador del animal, quien, muy probablemente, aportará una información distorsionada o incompleta.

El **diagnóstico clínico** se instaura conforme al análisis de los signos que presenta el animal. En muchas ocasiones resulta difícil relacionar causa-efecto, en parte porque muchas parasitosis cursan con cuadros clínicos muy similares, y solamente proporcionan una aproximación al agente etiológico. Otro inconveniente reside en que muchas parasitosis cursan de forma subclínica (Proudman y Matthews, 2000; Madeira *et al.*, 2007; Ionita *et al.*, 2010).

Con el **diagnóstico de laboratorio** se pretende identificar el agente etiológico de forma directa o indirecta, por medio de la observación de sus formas parásitas, preparásitas, o de aquellos parámetros que puedan ser relacionados con un tipo de parasitosis muy concreta (anemia-nematodos gastrointestinales, inmunoserodiagnóstico, etc.). Este cometido no es difícil en el caso de algunas especies, principalmente las que tienen su localización definitiva en el tracto gastrointestinal, o presentan fases en su ciclo de vida que son eliminadas al medio por los diferentes tipos de excreciones (heces, orina, etc.). Sin embargo, pueden surgir complicaciones cuando se requiere la utilización de medidas indirectas, cuyo uso está condicionado por la accesibilidad a las formas parasitarias (fases tisulares) o la dificultad de identificar algunas especies parásitas por sus características morfológicas (*Babesia* y *Theileria*). El diagnóstico indirecto se basa generalmente en el estudio de la respuesta inmunitaria del hospedador. Aunque este procedimiento se analizará en detalle más adelante, hay que tener presente que la detección de anticuerpos específicos no se puede correlacionar directamente con infecciones activas.

Las técnicas desarrolladas para la detección **de marcadores moleculares genéticos** ofrecen una inequívoca verificación de la presencia del parásito, pero no de su viabilidad. Hay que tener en cuenta que algunos de los procedimientos actuales, como la hibridación ADN-ADN, proporcionan una información cuantitativa, mientras la mayoría aporta datos cualitativos crudos –secuencias de nucleótidos, fragmentos de restricción, dianas- y que como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de un parásito en un organismo no siempre produce enfermedad (Gasser *et al.*, 2004; Traversa *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2010; McWilliam *et al.*, 2010; Bohórquez *et al.*, 2011).

La forma más directa de localizar la gran mayoría de los parásitos es la **necropsia** del animal afectado, pero no resulta practicable en aquellas especies que han adquirido un valor económico

o sentimental muy grande (animales de compañía, competición, exhibición, etc.), por lo que las pruebas de laboratorio constituyen el más frecuente e importante método en el diagnóstico del agente etiológico.

1.2.1. Principales técnicas de diagnóstico parasitológico en équidos

A) Clínico

Existen diferentes factores que influyen en la intensidad de los signos clínicos ante infecciones parasitarias en équidos, como el agente etiológico, carga parasitaria, condición corporal del animal, estado fisiológico o época del año (Matthews y Morris, 1995). En general, la presencia de parásitos internos como nematodos o cestodos suele cursar de forma subclínica, provocando, pérdida de peso, alteraciones en el hemograma (anemia, linfocitosis) y mal aspecto del pelaje (Proudman y Matthews, 2000; Ionita et al., 2010).

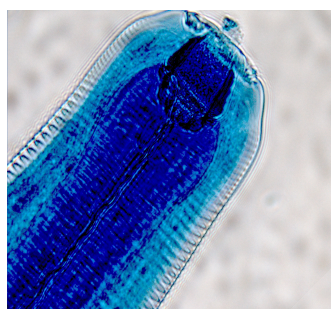
Casi no existen estudios que versen sobre las **protozoosis** equinas, y menos aun sobre su significación clínica. No se ha observado relación entre la infección por *Cryptosporidium* spp. y la presencia de diarrea en potros (Burton et al., 2010).

Las **encefalomielitis protozoarias** equinas, provocadas por *Sarcocystis neurona* y *Neospora hughesi*, se caracterizan por el desarrollo de signos neurológicos como ataxia (descoordinación asimétrica), debilidad y espasticidad (Hoane et al., 2005; Arias et al., 2012a).

La presencia de trematodos (*Fasciola hepatica* es el principal en los caballos) en el hígado está asociada al desarrollo de lagunas hemáticas, fibrosis focal y alteraciones en la eliminación normal de la bilis, que puede evolucionar a ictericia (Arias et al., 2012b).



Numerosas investigaciones han establecido la correlación entre la parasitación por **cestodos** en equinos (*A. perfoliata*) y la aparición de alteraciones digestivas entre las que cabe destacar los cólicos (Barrett et al., 2005; Morgan et al., 2005; Trotz-Williams et al., 2008; Traversa et al., 2008). Existen diferentes grupos de nematodos parásitos con notable patogenicidad. Los potros constituyen el principal grupo de riesgo de infección por **ascáridos** (*Parascaris equorum*), aunque también pueden afectar a caballos adultos (Francisco et al., 2011a). Las fases juveniles provocan durante su migración problemas respiratorios como tos y moqueo nasal, e incluso bronco-neumonía. La presencia de adultos causa retraso en el crecimiento, pelaje sin brillo y episodios diarreicos. En infecciones masivas, las formas adultas pueden ocluir parcial o totalmente el intestino. Los caballos pueden presentar abdomen hinchado e incluso peritonitis.



La infección por **ciatostominos** (pequeños estróngilos) provoca una enteropatía inflamatoria que repercute en la motilidad y microcirculación intestinal (Love et al., 1999). En caballos con formas adultas son frecuentes diarrea intermitente, pérdida de peso, mal aspecto del pelaje, anorexia, letargia, deterioro de la condición y edema periférico (Matthews y Morris, 1995). Se han encontrado valores anormalmente incrementados de actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin-kinasa (CK) (Francisco et al., 2011a).

Un aspecto particular lo constituye la ciatostominosis larvaria, que cursa con diarrea severa, pérdida de proteínas a nivel sanguíneo y disminución del peso (Ionita et al., 2010). Los parámetros bioquímicos alterados son hipoalbuminemia (≤ 20 g/L) y disminución del ratio albumina/globulinas (≥ 0.7) (Chapman et al., 2001).

Los **grandes estróngilos** son más patógenos que los pequeños, debido a las migraciones intraorgánicas que realizan. La aparición de trombos y arteritis, cólico severo e incluso la muerte de los equinos se ha relacionado con la infección por *S. vulgaris*, considerado el principal patógeno de los caballos (Nielsen et al., 2008). En los últimos años el empleo intensivo de

antihelmínticos ha reducido su prevalencia (Döpfer *et al.*, 2004; von Samson-Himmelstjerna, 2012).

La habronemosis gástrica se asocia en caballos a diarrea, pérdida de peso progresiva, gastritis catarral y ulceraciones (Traversa *et al.*, 2006).

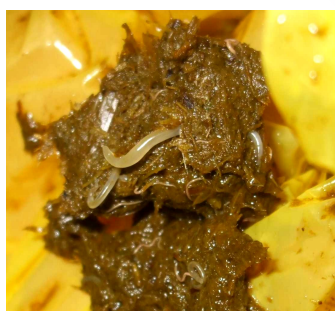
B) Laboratorial

Copromicroscópico

Como ya se mencionó anteriormente, constituye el procedimiento más empleado en la actualidad. El examen de las heces proporciona información no sólo de parásitos del tracto gastrointestinal, sino también de aquellos que se encuentran en otras partes del cuerpo, y que eliminan huevos o larvas que pasan por el aparato digestivo, por ejemplo, cuando el caballo deglute los huevos de los nematodos pulmonares.

Las muestras fecales deben de recogerse directamente del recto para evitar su contaminación fundamentalmente con nematodos de vida libre. Es aconsejable procesar las heces lo antes posible, y en caso contrario, deberán de conservarse refrigeradas, o en formol tamponado al 4-8%, para impedir que algunos estadios como los huevos continúen su evolución y dificulten su identificación.

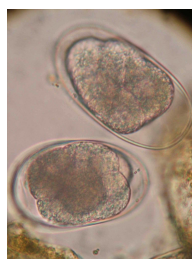
El examen macroscópico de las mismas permite comprobar su consistencia, color, presencia de sangre, moco, etc., y sobre todo la presencia de algunos parásitos o porciones de ellos o sus larvas que pueden ser detectados a simple vista, como proglotis de cestodos, hembras de oxiúridos, strongilados y larvas de gasterófilos (Meana *et al.*, 2005).



Se han descrito numerosas formas de procesar las muestras, desde simples extensiones hasta laboriosas técnicas cuantitativas, pero las

más utilizadas siguen siendo las recomendadas por el Central Veterinary Laboratory de Weybridge.

La técnica de **sedimentación** se aplica para el diagnóstico de formas parasitarias de alto peso específico como ooquistes de *Eimeria leuckarti* o huevos de *Fasciola hepatica*, lo que permite concentrarlos en el sedimento tras repetidos lavados para eliminar los detritus. Para cuantificar el número de huevos por gramo de heces se utilizan cámaras McMaster. El burro es el équido más susceptible de padecer fasciolosis (Vargas *et al.*, 2001).



Como su nombre indica, con la **flotación** se persigue, mediante el empleo de soluciones de mayor densidad que el agua, forzar la flotación de las formas parasitarias, permitiendo así la observación de coccidios, huevos de cestodos y la mayoría de los huevos de nematodos (Madeira *et al.*, 1999). Se recomienda la solución saturada de cloruro sódico o la de sacarosa. Los recuentos de huevos se realizan con cámaras McMaster. Un aspecto a considerar es que cuanto más densa en la soluciones en contacto con las formas parasitarias mayor es la presión exterior lo que provoca su deformación, colapso e incluso rotura de los huevos, por lo que el tiempo de procesado y lectura de la muestra debe de ser breve.

Sanguíneo

Las piroplasmosis en caballos son enfermedades causadas por los protozoos hemáticos *Babesia caballi* y *Theileria equi*, transmitidos por garrapatas ixódidos. Con frecuencia aparecen como brotes enzoóticos caracterizados por un síndrome hemolítico con signos clínicos atípicos y evolución aguda o crónica.

Debido a la dificultad del diagnóstico etiológico, con frecuencia se recurre al diagnóstico clínico, que se basa en el conocimiento de los antecedentes de las explotaciones y del área geográfica, y en la época de actividad de los vectores. España es un país endémico y la enfermedad tiende a cursar de forma subclínica o crónica, especialmente en la theileriosis en la que los animales quedan como portadores una vez infectados, pudiendo desarrollar un cuadro clínico cuando la

inmunidad se ve comprometida por sobreesfuerzos físicos, estados fisiológicos o enfermedades concomitantes.

Es raro observar signos evidentes de hipertermia, anemia e ictericia. La hemoglobinuria es poco frecuente en équidos, y sólo la merma del rendimiento del animal debe considerarse suficiente para valorar el nivel de anticuerpos frente a ambos piroplasmas. Cuando hay signos agudos es posible observar los parásitos en los hematíes.

Cutáneo



La identificación de los parásitos de la piel puede realizarse a simple vista tras su recogida con pinzas o cepillado (piojos, moscas, garrapatas, etc.), o mediante exámenes microscópicos después de procesar una muestra obtenida por raspado.

En presencia de signos como prurito, alopecia e inflamación perianal se debe sospechar de infección por oxiúridos, en tanto que si aparecen pequeñas pápulas, pioderma y liendres, el diagnóstico será de pediculosis. La sarna, especialmente la sarcóptica, suele caracterizarse por prurito, nódulos, escamas, pústulas, alopecia, zonas engrosadas de la piel.

El raspado cutáneo debe realizarse profundamente con una hoja de bisturí en las zonas enfermas de la piel, hasta que se produzca una leve hemorragia. Si se sospecha de demodicosis, puede ser útil presionar previamente la piel entre los dedos índice y pulgar para favorecer la expulsión de los *Demodex*, y recoger este material en una placa Petri en cantidad suficiente para identificar las formas parasitarias.

Un buen diagnóstico requiere de la toma de muestras de lesiones cutáneas recientes, procurando recoger costras y escaras; también es aconsejable retirar las muestras de pelo entero, arrancándolas con el folículo piloso, para asegurar el diagnóstico de *Demodex*. El producto del raspado se coloca en un portaobjetos en el que previamente se han depositado 2-3 gotas de lactofenol o de aceite mineral. Después de extender y aplastar bien la muestra, se coloca el cubre y se observa a poco aumento (4X) para visualizar liendres, piojos, larvas de ácaros

(*Neotrombicula*); después se observa a mayor aumento para visualizar los agentes de las sarnas (objetivo de 10X-40X). (Francisco et al., 2009).

C) Post-mortem

El examen de los caballos sacrificados permite la identificación de ejemplares de parásitos adultos y de fases larvianas en órganos y vísceras. Aunque hoy en día se dispone de técnicas de diagnóstico laboratorial *in vivo*, el diagnóstico fiable de algunas parasitosis conlleva la realización de la necropsia del animal, como sucede con la fasciolosis (Yépez y Sánchez, 1981), cestodosis (Meana et al., 2005) o habronemosis gástrica (Traversa et al., 2007). Resulta evidente que no se utiliza de forma rutinaria y generalizada para el diagnóstico, aunque supone una gran contribución para el conocimiento de las enfermedades parasitarias y su control, puesto que tienen mayor sensibilidad que procedimientos como la coprología o el ELISA, indican la presencia de infección parasitaria en el momento de la toma de muestras, y hacen posible la identificación de las especies de parásitos que afectan a los équidos (Hodgkinson et al., 2005; Nielsen et al., 2008).



El análisis post-mortem de las diferentes vísceras y órganos de los equinos sacrificados permite la obtención de parásitos adultos, que se identifican más fácilmente que las larvas 3 desarrolladas en los coprocultivos.

1.2.2. Inconvenientes que plantean las principales técnicas de diagnóstico parasitológico en équidos

La observación de signos clínicos comunes a diferentes infecciones parasitarias sugiere que el diagnóstico clínico debe de estar apoyado siempre por la identificación laboratorial del agente etiológico. Como se mencionó con anterioridad, las técnicas compromicroscópicas pueden poner de manifiesto la presencia de patógenos que afectan al aparato digestivo o al respiratorio.

Las **coccidiosis** son enfermedades asociadas al hacinamiento, falta de higiene y a la edad. En potros de más de 6 semanas con diarrea debe sospecharse la posibilidad de eimeriosis

ocasionada por *Eimeria leuckarti*. El diagnóstico se basa en la observación de los ooquistes en las heces; son de gran tamaño por lo que el diagnóstico coprológico aconsejado es mediante sedimentación o por flotación con soluciones muy densas. En los animales recién nacidos con diarrea es conveniente descartar la infección por *Cryptosporidium parvum* mediante la técnica de Ziehl Neelsen modificada.

Resulta obvio señalar que las **encefalomielitis protozoarias** no se pueden detectar mediante análisis de heces.

El ciclo endógeno de ***F. hepatica*** en los caballos demora hasta 4 meses post-infección (Soulé et al., 1989), y la eliminación de huevos en heces se observa en caballos con una elevada intensidad de parasitación (Gorman et al., 1997; Muñoz et al., 2008).



Aunque el examen coprológico es muy específico para el diagnóstico de las **cestodosis**, debido a la morfología característica de los huevos de *Anoplocephala*, en ocasiones permanecen en el interior de los proglotis, se distribuyen de forma irregular en la masa fecal o se produce su liberación de forma intermitente, pudiendo no ser detectados (Kjaer et al., 2007). Se han diseñado métodos coprológicos específicos que permiten, con un procesamiento más largo y complejo obtener mejores resultados que con los métodos rutinarios (Proudman y Edwards, 1992; Elsener y Villeneuve, 2011). Otra recomendación consiste en el tratamiento de los animales sospechosos y análisis de las heces recogidas a las 24-48 horas (Slocombe, 2006; Elsener y Villeneuve, 2011), consiguiéndose aumentar la sensibilidad del 62% antes del tratamiento al 100% después, posiblemente debido a que el antihelmíntico provoque la desintegración de los cestodos muertos, permitiendo así aumentar la excreción y dispersión de los huevos.

Teniendo en cuenta que ***Parascaris equorum*** realiza una migración intraorgánica desde el intestino (al ingerir los huevos con larvas L2 en su interior) hasta el hígado y el pulmón, para regresar al intestino y alcanzar la madurez sexual y comenzar la eliminación de huevos, su diagnóstico no podría confirmarse con la presencia de huevos en heces (Kornaś et al., 2010).

La sospecha de parasitación por **estrongilosis digestivas** se basa en la sobreexplotación de los pastos, los tratamientos antihelmínticos poco regulares, la pérdida de peso, anemia, etc. El diagnóstico clínico es difícil, los exámenes coprológicos no permiten diferenciar morfológicamente los huevos de las distintas especies de ciatostominos y de otros estróngilos digestivos, y se ha de recurrir a la realización de coprocultivos para obtener las larvas 3 infectivas, diferenciables entre sí en los distintos géneros de acuerdo a algunas claves de identificación (Lichtenfelds *et al.*, 2008).

En los exámenes rutinarios de las heces por flotación suelen aparecer huevos de ***Oxyuris equi*** (Francisco *et al.*, 2009), pero el diagnóstico correcto se basa en la observación de intenso prurito anal en caballos a consecuencia de la sustancia cementante que las hembras del parásito utilizan para pegar los huevos alrededor del ano, y en la identificación de huevos *O. equi* adheridos a cintas de papel adhesivo colocadas alrededor del ano, que se examinan al microscopio.

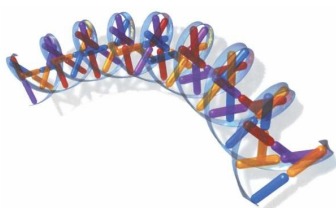


Es importante considerar que existen algunas infecciones que cursan con más de una presentación, como por ejemplo la habronemosis, que puede aparecer en forma de habronemosis gástrica o como proceso cutáneo (Schuster *et al.*, 2010; Buzzell *et al.*, 2010).

Se han realizado algunos intentos para incrementar la fiabilidad de estas técnicas. Una de ellas consiste en la recogida de toda la materia fecal excretada por los equinos 3 días antes del tratamiento antiparasitario y 3 días después (Dawson, 2003). Las heces se introducen en bolsas de nylon (50 x 50 cm y 10 µm de diámetro de poro) que se sellan y se someten a un ciclo en frío en una lavadora convencional. Finalizado éste, se recoge todo el contenido retenido en las bolsas, y se observa macroscópicamente la presencia de adultos de *Anoplocephala*, *Gasterophilus* y *Oxyuris*.

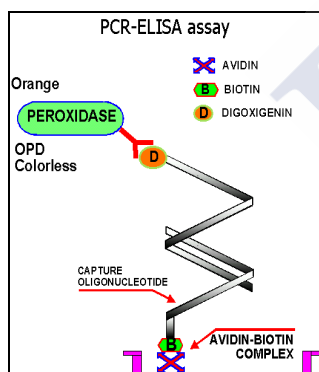
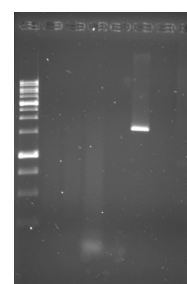
El sistema FLOTAC® consiste en realizar flotación en una centrífuga, seguido de la traslación de la porción apical a la suspensión en flotación. Esta técnica permite la cuantificación de ooquistes, huevos y larvas en una muestra de 1 g de heces (Utzinger *et al.*, 2008).

1.3.- DIAGNÓSTICO MEDIANTE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS



Pese a que no se utilizan de forma rutinaria y generalizada para el diagnóstico, las técnicas de Biología Molecular suponen una gran contribución al control de las enfermedades parasitarias, por su mayor sensibilidad que otros procedimientos como la coprología o el ELISA, indican la presencia de infección activa, y hacen posible la identificación de las especies de parásitos que afectan a los équidos (Bowles *et al.*, 1995; Klei, 2000; Van Herwerden *et al.*, 2000), lo que permite solucionar los problemas derivados de otras técnicas como es el caso de la identificación de las diferentes especies de ciatostominos a partir de las características morfológicas de las larvas 3 (Dowdall *et al.*, 2002).

Los primeros ensayos para la detección de ácidos nucleicos consistieron en la puesta a punto de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), que se aplicó al diagnóstico de cestodosis y estrongilosis (Gasser *et al.*, 2004; Hodgkinson, 2006). La visualización de los productos de ADN se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa, y posteriormente se emplearon también geles de acrilamida (Traversa *et al.*, 2008).



Se han aplicado diferentes técnicas para el revelado de los productos de PCR, basadas en la utilización de técnicas inmunoenzimáticas para la detección de ácidos nucleicos de parásitos, siendo la PCR-ELISA la variante más conocida. Se han diseñado oligonucleótidos específicos de 4 especies de ciatostominos, *Cylicocyclus asworthii*, *Cyc. nasatus*, *Cylicostephanus longibursatus* y *Cys. goldii* (Hodgkinson *et al.*, 2001).

Otra posibilidad consiste en la *reverse line blot*. Mediante la extracción de ADN de larvas de un grupo de ciatostominos, esta técnica ha permitido identificar de forma simultánea 13 especies, diferenciándolas de las 3 especies de *Strongylus* spp. que pueden afectar a los caballos (Traversa *et al.*, 2007). También se han obtenido buenos resultados empleando huevos de estrongilados eliminados en las heces de equinos parasitados (Ionita *et al.*, 2010). Esta prueba fue concluyente

en la detección de infecciones por cestodos *Anoplocephala* y nematodos *Habronema* y *Draschia* (Traversa *et al.*, 2004, 2008).

En ocasiones se ha empleado la *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) para el diagnóstico de criptosporidiosis equina (Burton *et al.*, 2010).

La técnica conocida como *real-time quantitative PCR* (PCR a tiempo real) constituye una posibilidad muy interesante para la detección cualitativa y cuantitativa de algunas infecciones parasitarias, asociándose la cantidad de ADN a la intensidad parasitaria (carga parasitaria) (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2002). La detección de los ácidos nucleicos mediante fluorescencia (*Fluorescence real-time quantitative PCR*) supone un avance muy importante, ya que evita el revelado por electroforesis (Nielsen *et al.*, 2008).

Pese a todos estos avances, existen opiniones acerca de la imposibilidad de estimar la carga parasitaria que afecta a los caballos con técnicas moleculares, lo que impide conocer su estado parasitológico. En las cestodosis se asume que esto sólo se puede conseguir con pruebas inmunoenzimáticas (Traversa *et al.*, 2008).

1.4.- DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Algunos de los inconvenientes de las técnicas coprológicas ya se han mencionado anteriormente. Otro de los problemas es que entre el momento de infección y la aparición de formas parasitarias demostrables en el análisis transcurre un periodo de tiempo (periodo de prepatencia) durante el cual tienen lugar las principales alteraciones patológicas, pero el análisis resulta negativo. La presencia de huevos en las heces indica la existencia de parásitos adultos en el animal, pero no refleja la posible presencia de estadios larvarios.

Existen diferentes pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos específicos en suero sanguíneo, como la hemaglutinación indirecta, aglutinación en látex o inmunofluorescencia indirecta, y actualmente la más empleada es el enzimoimmunoassay (Packham *et al.*, 2002). Todas ellas se orientan a poner en evidencia la posible reacción antígeno-anticuerpo.

1.4.1. Antígenos parasitarios

En el diagnóstico de parasitosis basado en el análisis de la respuesta inmunitaria humoral se emplean diferentes clases de antígenos, que fundamentalmente se pueden agrupar en 3 clases, **nativos** u obtenidos directamente a partir de los parásitos, **purificados** y **recombinantes** (Paz-Silva, 1997; Arias, 2007).

Antígenos nativos

Existen 3 preparados antigénicos que en orden creciente de complejidad estructural se denominan de **superficie**, **somáticos** y de **excreción/secreción**.

Los antígenos de superficie están asociados a la membrana externa, cutícula o tegumento de los parásitos. Se emplean con frecuencia en el diagnóstico de parasitosis causadas por protozoos como *Sarcocystis neurona* (Howe et al., 2008), *Neospora* spp. (Jakubek et al., 2006) o *Toxoplasma gondii* (Ghazy et al., 2007; Dangoudoubiyam et al., 2011), pero se descartan en el diagnóstico de helmintosis por la elevada inmunidad cruzada entre diferentes parásitos. La liberación de la membrana externa de los protozoos para conseguir estos antígenos se lleva a cabo mediante la exposición de sus zoítos a diferentes concentraciones de detergentes, o aplicando ciclos sucesivos de congelación/descongelación (El-Ghaysh, 1998; Kouam et al., 2010).

La producción de antígenos somáticos consiste en someter a los parásitos a la acción de un homogeneizador tisular, procedimiento que proporciona una elevada concentración de preparados. En diversos estudios se ha destacado que gran parte de los componentes estructurales de los parásitos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y con frecuencia existen moléculas comunes a distintos géneros y especies, que explica la existencia de un gran número de reacciones cruzadas y la menor especificidad de los antígenos parasitarios totales (Barriga, 1981). Por ello, esta opción suele aplicarse a agentes de notable tamaño que no están vivos (Proudman y Trees, 1996b).

Los preparados de excreción/secreción (también denominados metabólicos) se obtienen incubando parásitos **vivos** en medio líquido, a fin de que liberen ciertas sustancias con actividad antigénica. En principio se utilizaban tampones como el PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7'4)



(Lehner y Sewell, 1980; Santiago y Hillyer, 1988), pero desde hace algunos años se emplean medios de cultivo celular como el RPMI (Roswell Park Memorial Institute), provistos de gran variedad de nutrientes, lo que prolonga la vida de los parásitos y de este modo incrementa la producción de antígenos (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010).

Antígenos purificados

A pesar de que los antígenos de excreción/secreción parecen más adecuados para el inmunodiagnóstico de diferentes parasitosis por su menor complejidad estructural (Miller, 1990; Sánchez-Andrade *et al.*, 2005), su purificación parcial podría incrementar la fiabilidad del diagnóstico (Paz-Silva *et al.*, 2011).

Al contrario de otras pruebas de diagnóstico como la inmunoelectrotransferencia, los antígenos en el ELISA se suelen emplear en estado nativo, en condiciones naturales, sin ser sometidos a la acción de agentes reductores como el β -mercaptoetanol, o el calor. Por este motivo, resulta interesante e incluso más útil el fraccionamiento de los antígenos mediante el empleo de técnicas que conserven sus características originales, dado que así se produce el contacto con el sistema inmunitario del hospedador definitivo. Entre estas técnicas se utiliza con mucha frecuencia la cromatografía líquida a baja presión, por ejemplo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) (Zimmerman y Clark, 1986; Mezo *et al.*, 2007). Se trata de un método en el que las sustancias a purificar se pasan por una columna de un polímero, y se pueden fragmentar en función de su peso molecular, carga, etc. Resulta sumamente útil por su elevada reproducibilidad y la posibilidad de automatizarlo (Francisco, 2007).



Antígenos recombinantes

Tanto los antígenos nativos como los que se obtienen tras su purificación entrañan un grave contratiempo: es necesario disponer de formas parasitarias en cantidad suficiente en el momento en que se va a proceder a la preparación del antígeno (Arias *et al.*, 2011). Este problema se

agudiza si el objeto es obtener productos de excreción/secreción, puesto que los organismos han de estar vivos y metabolizar el medio de cultivo líquido en el que se incuban.



La visita a los mataderos es la principal opción para recoger formas parasitarias, incluso vivas (en función del tiempo transcurrido desde el sacrificio de los animales). Sin embargo, no es frecuente encontrar animales abatidos de todas las especies de interés; también es normal que el porcentaje de parasitación sea más bien bajo, y por último es preciso tener en cuenta que algunos parasitismos presentan una marcada estacionalidad.

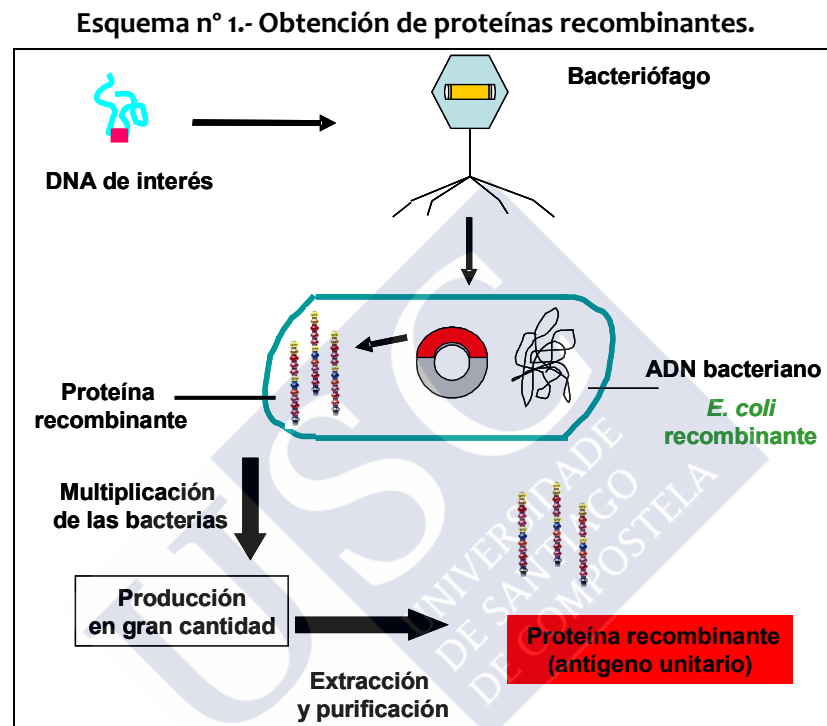
Todos estos contratiempos dificultan la obtención de antígenos, por lo que cabría realizar visitas periódicas y mezclar los productos obtenidos, aunque sería posible encontrar diferencias entre los mismos, atendiendo a la variabilidad topográfica de los parásitos, raza de los animales, etc.

Esto ha impulsado la producción de antígenos unitarios con independencia de la presencia física de los parásitos., aprovechando el rápido desarrollo que ha experimentado la Biología Molecular.

La capacidad de purificar ARNm de diferentes estadios del ciclo biológico de un parásito y obtener a partir de ellos bibliotecas de ADNc, es fundamental para la identificación de la capacidad inmunógena de las proteínas parasitarias. Potencialmente, los antígenos parasitarios pueden obtenerse de forma *recombinada* en gran variedad de vectores (Spithill y Dalton, 1988). Las proteínas recombinantes resultan de la expresión de ADN recombinante o recombinado, que se obtiene mediante la unión *in vitro* de ADN de dos especies diferentes (Cohen *et al.*, 1973).

Para la obtención de ADN recombinante, uno de los procedimientos más empleados es la construcción de una biblioteca de ADNc, que es una mezcla de clones obtenidos mediante la inserción de ADN genómico o ADNc en un vector adecuado. Es interesante tener en cuenta que la clonación es el proceso de hacer copias de un individuo total o de alguna parte de él (un

fragmento específico de ADN, generalmente un gen). Para ello, se aísla la secuencia de ADN que se desea clonar y se implanta en un microorganismo, utilizado como vector de clonación (normalmente alguna especie de bacteria), para obtener copias del fragmento insertado. Generalmente se utilizan virus bacteriófagos como vectores, y el ADN de interés se introduce en plásmidos o fragmentos de ADN extranuclear (Esquema 1). El paso siguiente consiste en la infección de bacterias con los fagos recombinantes, y su crecimiento en placas de cultivo (Rodríguez-Pérez et al., 1992).



La expresión de genes en bacterias es la forma más sencilla y económica de obtener suficiente cantidad de proteína, siendo *E. coli* la bacteria más empleada porque está bien caracterizada y existen diferentes promotores que hacen posible la producción eficiente de proteínas recombinantes (Dalton et al., 2003a, b). El inconveniente es que muchas proteínas expresadas en *E. coli* se hacen insolubles, como cuerpos de inclusión intracelulares, debido en parte a que el citoplasma de *E. coli* es un ambiente reductor desfavorable para la formación de un correcto enlace disulfuro (Baneyx, 1999). Es una bacteria gram-negativa que puede acumular proteínas de forma soluble en el citoplasma, secretarla en el periplasma, expresarlas en la membrana de superficie o eliminarlas al medio de cultivo (Smith et al., 1986).

1.4.2. Pruebas serológicas: enzimoimmunoensayo (ELISA)

Toda técnica de diagnóstico eficaz ha de facilitar posible la detección precoz de animales infectados, para evitar el desarrollo de lesiones (Espino *et al.*, 1997). El enzimoimmunoensayo (ELISA, *enzyme linked-immunosorbent assay*) ofrece muchas ventajas sobre el resto de técnicas serológicas, (buena especificidad, alta sensibilidad y fácil reproducibilidad), Con este método se puede alcanzar una fiabilidad del 100% cuando el porcentaje de parasitación supera al 40% en el rebaño (Wescott *et al.*, 1984; Ibarra *et al.*, 1998). Otra ventaja del ELISA es su posibilidad de



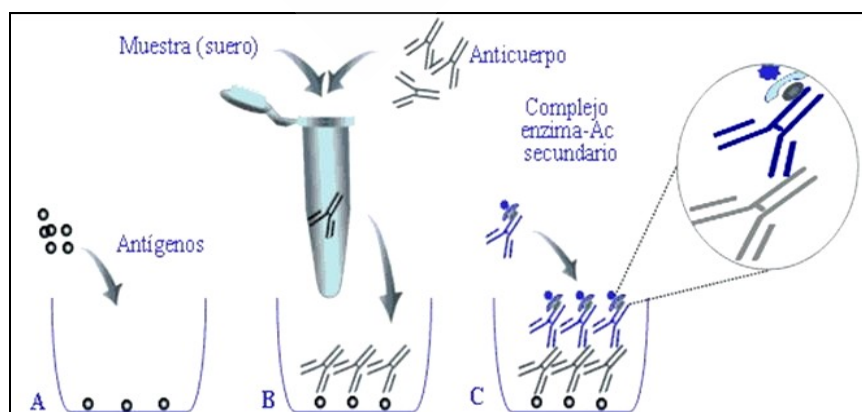
automatización, lo cual permite un ahorro en los reactivos (Trudgett *et al.*, 1988). Se trata de un procedimiento que se desarrolla en una fase sólida, generalmente placas de diferentes polímeros, con 96 pocillos en los cuales tiene lugar la reacción enzimática. Tras diferentes etapas, en las cuales se van añadiendo el material en

estudio (sueros, lactosuero, sobrenadante fecal), un inmunoconjugado y un sustrato cromogénico soluble específico, tiene lugar una reacción cuya Densidad Óptica se cuantifica en un espectrofotómetro de placas y a una longitud de onda determinada, en función de la enzima del inmunoconjugado. En el siguiente esquema se resume el protocolo de la técnica inmunoenzimática para la detección de anticuerpos, pudiendo comprobarse que se desarrolla en 3 etapas:

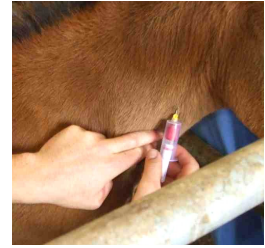
A.- Sensibilización del fondo de los pocillos con solución de antígeno.

B.- Adición de sueros problema.

C.- Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo.



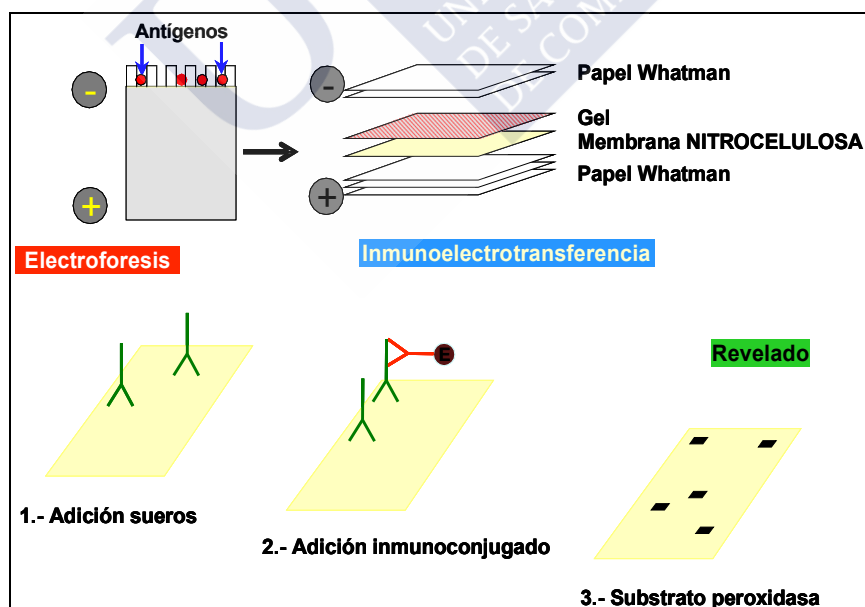
El complejo enzima-anticuerpo secundario o inmunoconjugado se puede adquirir en diversos laboratorios, que proporcionan también placas sensibilizadas con diferentes antígenos, aunque este no es el caso en el diagnóstico de infecciones parasitarias equinas. Por este motivo, la correcta toma de muestras y la sensibilización con antígenos se convertirían en las fases críticas del ELISA. Al tratarse de una reacción colorimétrica, es imprescindible evitar la hemólisis en la muestra, que probablemente proporcionaría resultados positivos casi sin aplicar el test.



1.4.3. Pruebas serológicas: inmunoelectrotransferencia (EITB)

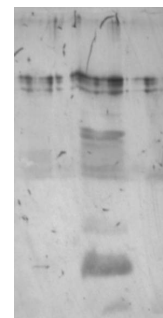
Esta técnica incluye 2 fases, en la primera se separan los antígenos mediante electroforesis y a continuación se transfieren desde geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa, y en la segunda tiene lugar el revelado inmunoenzimático de la reacción entre los anticuerpos presentes en el suero de los animales y los diferentes polipéptidos transferidos a la membrana.

La utilización de la electroforesis para separar los antígenos en sus distintos componentes confiere una mayor sensibilidad y especificidad a este método de diagnóstico, y reduce la interferencia de la inmunidad cruzada entre antígenos de diversos parásitos.



El resultado final es la observación de una serie de bandas que señalan la reacción entre los anticuerpos y el antígeno ligado a la membrana.

La inmunoelectrotransferencia no se emplea de forma rutinaria porque resulta costosa y ardua, proporcionando los resultados después de 6-8 horas al menos (Yépez-Mulia *et al.*, 1999).

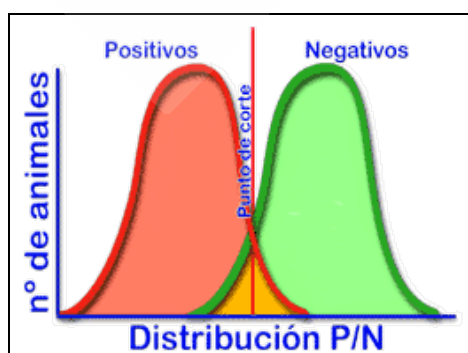


1.4.4. Determinación del punto de corte

Otro aspecto importante es el establecimiento correcto del valor límite de la densidad óptica a partir del cual se consideren positivas las muestras, o **punto de corte**. Este punto varía según las condiciones en las que se produzca la reacción enzimática, ya que puede verse afectada por diversos factores como: modelo de placas utilizadas, naturaleza y dilución del conjugado, estado de los tampones, etc.; en consecuencia todas estas condiciones deben estandarizarse convenientemente.

Poblaciones testigo enferma y sana

El primer sistema empleado para establecer el punto de corte en la aplicación de enzimoimmunoensayos ELISA, y que le confirió tal denominación, consistió en representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos en 2 poblaciones de individuos claramente clasificados en enfermos y sanos. La determinación del punto de corte se establece precisamente como el valor resultante del corte de estas 2 poblaciones (Krieg *et al.*, 1986).



El principal inconveniente de esta estimación radica en el requerimiento de disponer de muestras de sueros de animales contrastados positivos (enfermos) y negativos (sanos), lo que no resulta fácil para todas las enfermedades.

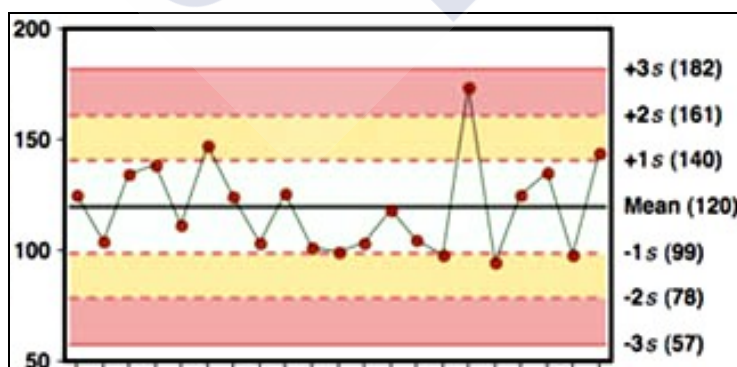
Sueros testigos negativos

En gran número de situaciones, especialmente ante enfermedades no diagnosticadas anteriormente, no es posible disponer de una población de individuos enfermos de los que extraer muestras séricas (Swets, 1988).

Para solucionar este inconveniente, se postuló el empleo de sueros testigos negativos, más fáciles de conseguir (al menos en teoría) porque se pueden obtener de animales muy jóvenes en los que existe completa seguridad de que no han tenido posibilidad de entrar en contacto con el agente patógeno.

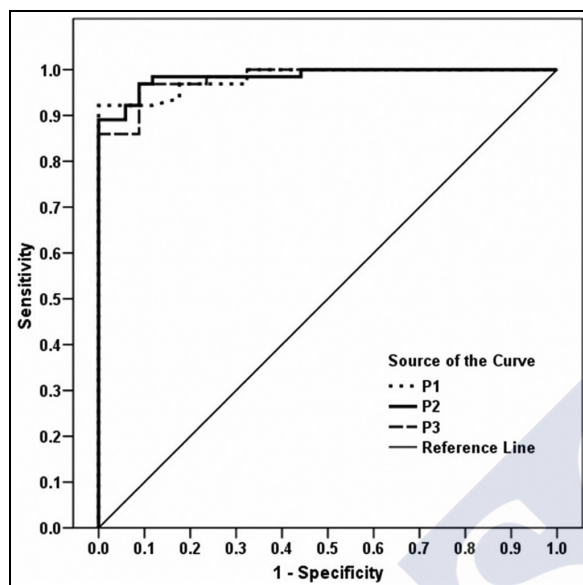
En 1930, un estadístico de los laboratorios de la Compañía Telefónica Bell (EEUU) desarrolló la base científica para el procedimiento de control estadístico, fundamentado en la idea de que de este modo era posible establecer unos límites en la elaboración, que sirviesen para determinar si el esfuerzo productivo se encontraba dentro de estos límites y por tanto resultaba rentable, o no (Shewart, 1931).

Profundizando en esta idea, Levey y Jennings (1950) introdujeron un sistema para evaluar la *garantía de calidad*, calculando un intervalo en el que deberían estar incluidos la mayoría de los casos. Este rango se calcula sumando el valor medio y la desviación estándar (DE).



Siguiendo este concepto, se define el punto de corte como el valor obtenido de la suma de la absorbancia media de un grupo de sueros negativos más 1 desviación estándar, 2 DE (Paz-Silva et al., 2003), 3 DE (Sánchez-Andrade et al., 2000) o más (Woo et al., 2007). La principal traba reside en la ausencia de un criterio unánime para calcular el valor de punto de corte.

En numerosas ocasiones se utilizan sueros de animales muy jóvenes que nunca han estado en



contacto con el agente etiológico, y no han desarrollado respuesta inmunitaria humoral frente al mismo, resultando valores muy bajos de corte. Aunque se desentrañará en detalle más adelante, es importante destacar que la exposición a antígenos parasitarios estimula la producción de anticuerpos, que se mantienen elevados durante largos periodos de tiempo, incluso después de tratamientos eficaces (Sánchez-Andrade et al., 2002). Esto constituye una importante dificultad para dirimir la

presencia de infecciones activas empleando métodos inmunoenzimáticos, puesto que un porcentaje elevado de individuos sería considerado como positivo (enfermo).

Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) o curvas de rendimiento diagnóstico

Para intentar solucionar los problemas que entraña la determinación del punto de corte, en los últimos años se ha orientado el análisis de la validez de un test (ELISA) en comparación con una prueba de referencia o *gold standard*, que en Parasitología Veterinaria suelen ser la necropsia y la coprología. El éxito de este procedimiento radica en la prueba de referencia empleada, y la conclusión final será precisamente si la técnica que se está probando (ELISA) se parece o no al *gold standard*.

Las curvas ROC representan la relación entre la sensibilidad y 1-especificidad para los posibles valores de corte. El área bajo la curva (AUC, *area under the curve*) es una medida de la validez del test, con un valor de 1 que representa la prueba perfecta (Jensen y Poulsen, 1992). Se trata de

una medida global de la exactitud de una prueba de diagnóstico, y se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos sano y enfermo, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicar la prueba, es decir, es la probabilidad de que el resultado de la prueba resulte más anormal en el paciente enfermo (Hanley y McNeil, 1982).

Se han establecido los siguientes intervalos para el AUC:

[0.5, 0.6): Test malo

[0.9, 0.97): muy bueno

[0.6, 0.75): regular

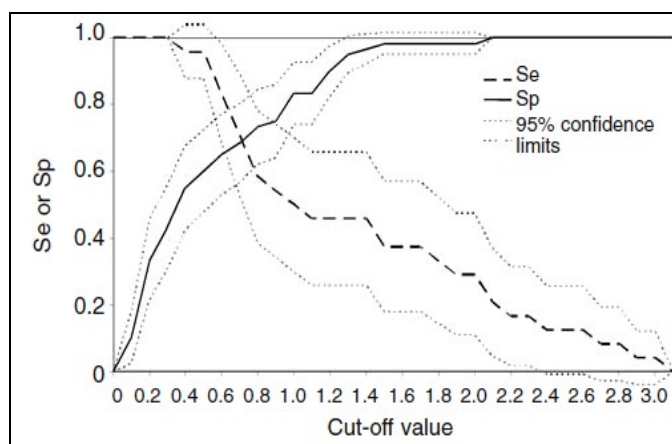
[0.97, 1): excelente

[0.75, 0.9): bueno

El origen de estas curvas se encuentra en la Segunda Guerra Mundial, cuando ingenieros eléctricos las idearon para el análisis de señales de radar, a partir de lo cual se desarrolló la Teoría de Detección de Señales. Después del ataque a Pearl Harbor en 1941, el ejército de EEUU inició un programa de investigación con el fin de detectar correctamente los aparatos japoneses a partir de las señales que emitían sus radares. Posteriormente, se aplicaron en medicina, radiología, psicología y otras áreas durante varias décadas.

La diagonal divide el espacio ROC. Los puntos por encima de la diagonal representan los buenos resultados de clasificación (mejor que el azar), puntos por debajo de la línea de los resultados pobres (peor que al azar). El mejor método posible de predicción se situaría en un punto en la esquina superior izquierda, o coordenada (0,1) del espacio ROC, representando un 100% de sensibilidad (ningún falso negativo) y un 100% también de especificidad (ningún falso positivo).

En los últimos años se ha llevado a cabo una modificación de esta curva que consiste en representar para cada posible punto de corte, los valores de especificidad y sensibilidad (Kjaer et al., 2007). De este modo, se simplifica considerablemente la estimación del valor del punto de corte, y además se introduce la posibilidad de hacerlo en función de las necesidades de cada situación.



Titulación sérica

En muchas ocasiones interesa conocer no sólo si el paciente tiene o no anticuerpos frente a un patógeno determinado, sino qué concentración o tasa de ellos tiene. Esto es útil ya que para muchas infecciones es posible correlacionar la concentración con la situación clínica o decidir si aquella ha sido una respuesta eficiente como resultado de una vacunación (Jenicek y Clèroux, 1987). Para ello, se realizan diluciones seriadas del suero que irán sucesivamente disminuyendo la concentración de anticuerpos; el título del suero será la última dilución del suero que da una reacción positiva.

En pruebas ELISA no se recurre a la titulación salvo cuando se emplean kits comerciales. Sin embargo, sí se emplea en la EITB, definiéndose como la última dilución del suero que provoca una reacción visible en una membrana previamente sensibilizada con un antígeno (Howe et al., 2005).

1.4.5. Ventajas del empleo de técnicas serológicas de inmunodiagnóstico

La aplicación de técnicas inmunoenzimáticas al diagnóstico de infecciones parasitarias ofrece importantes utilidades, desde el punto de vista de realización/coste, y de la información que proporcionan (Burgueño et al., 1995). Ya se ha mencionado previamente que en la mayoría de los casos, el estudio de la presencia de anticuerpos específicos frente a antígenos parasitarios se lleva a cabo con procedimientos ELISA en placa, porque es posible procesar un número elevado (en torno a 88 muestras/placa) de sueros al mismo tiempo, reduciendo el tiempo de obtención de los resultados y el importe final (Sánchez-Andrade, 1994).

A excepción del inmuconjugado, las soluciones/tampones que se utilizan en estas pruebas se pueden preparar con facilidad en el laboratorio, lo que contribuye a reducir el **coste**, al igual que sucede con la posibilidad de automatizar todo el procedimiento (Trudgett *et al.*, 1988).

En algunas enfermedades parasitarias en las que no es posible aplicar las técnicas copromicroscópicas, sobre todo las provocadas por agentes que no afectan al aparato digestivo o respiratorio, la detección de anticuerpos constituye casi el procedimiento de elección, porque su importe es asumible (en mayor medida) que la aplicación de otras pruebas como las de base molecular, diagnóstico por imagen, etc. (Yépez-Mulia *et al.*, 1999).

Hasta hace algunos años los substratos cromogénicos que se empleaban estaban formados por moléculas de composición química *inestable* (dobles o triples enlaces), y por ello tóxicos (cancerígenos). Actualmente se pueden utilizar compuestos quimioluminiscentes, que disminuyen los riesgos para la salud que entraña su manipulación.

El fundamento de las pruebas inmunológicas es *revelar* la posible reacción **anticuerpo – antígeno**. Teniendo en cuenta que la exposición del sistema inmunitario de los mamíferos a algunas sustancias que son reconocidas como *extrañas* (antígenos) induce una respuesta humoral caracterizada por la producción de anticuerpos detectables en sangre (suero), uno de los principales beneficios que proporcionan estas técnicas es la **precocidad** en la detección de las infecciones, particularmente importante en las parasitosis que cursan con la eliminación de ooquistes/huevos/larvas a través de las heces, ya que el periodo de prepatencia se reduce considerablemente.

Se define **reproductibilidad** como la capacidad para obtener resultados iguales o de gran similitud tras la aplicación repetida de una técnica, empleando los mismos elementos y parámetros a lo largo de todo el proceso. Algunos estudios demostraron que varía según el ensayo se realice en la misma placa o en otra placa diferente, en un grado del 9% y 26% respectivamente (Oldham, 1983). Marín (1992) señaló que ésta variaba en un 3'5% dentro de la misma placa, y un 15'3% entre placas distintas.

Los resultados obtenidos con pruebas inmunológicas parecen tener mayor validez cuando la prueba se aplica a todo un rebaño (Pfister, 1990), por lo que se señala su utilización para realizar encuestas epidemiológicas (Wescott et al., 1984; Marín et al., 1993).

1.4.6. Fiabilidad y exactitud de las técnicas inmunoenzimáticas

Se entiende por *fiabilidad* la validez de una técnica de diagnóstico, y *exactitud* es la capacidad para clasificar correctamente a los individuos en sanos o enfermos (Sackett et al., 1989). Ambos términos se suelen considerar *sinónimos* o muy próximos, y su determinación descansa fundamentalmente en el cálculo de 4 parámetros, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, que se establecen normalmente en *comparación* con otra prueba que se considera *veraz*, y que se denomina **Gold Standard** (Thrusfield, 2005).

La determinación de estos valores se lleva a cabo mediante la elaboración de una tabla de contingencias de doble entrada, en la que se recogen los resultados obtenidos tras la aplicación de las 2 técnicas:

		Prueba de referencia		
		Pos	Neg	
E L I S A	Pos	a	b	a + b
	Neg	c	d	c + d
		a + c	b + d	Total

La **sensibilidad** es la capacidad para detectar verdaderos positivos de entre un grupo de animales enfermos. Por **especificidad** se entiende la capacidad de una técnica para la detección de verdaderos negativos y que no aparezcan falsos positivos.

$$\text{Sensibilidad (s)} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{d}{b + d}$$

El **valor predictivo positivo (VPP)** mide la **proporción de verdaderos positivos en el total de positivos detectados**, mientras que el **negativo (VPN)** se refiere a la relación de verdaderos negativos en el total de negativos observados.

$$VPP = \frac{a}{a + b} \quad \quad VPN = \frac{d}{b + d}$$

Teniendo en cuenta que estos parámetros dependen de la prevalencia (porcentaje de casos positivos), se consideró oportuno introducir los conceptos de **razón de verosimilitud (positiva y negativa)** (Knottnerus *et al.*, 2002). La **razón de verosimilitud positiva (RVP)** establece la relación entre la posibilidad de acertar en el diagnóstico de un enfermo y la de equivocarse, en tanto que la relación entre la posibilidad de equivocarse en el diagnóstico de un paciente sano y la de acertar es la **razón de verosimilitud negativa (RVN)**.

$$RVP = \frac{S}{1 - E} \quad \quad RVN = \frac{1 - S}{E}$$

Finalmente, también se calcula el valor para el estadístico kappa (κ), medida de concordancia entre el diagnóstico proporcionado por 2 técnicas (Fleiss, 2000).

De la comparación de la técnica ELISA con otras de referencia se espera que S, E, VPP y VPN superen el 90% y $\kappa > 0,8$, en tanto que no existe un criterio único para la interpretación de RVP y RVN (Krieg *et al.*, 1986). Sin embargo, es necesario recordar que todos estos parámetros se calculan en relación a otra técnica, y que esta forma de proceder implica que, como máximo, el ELISA sólo podría igualar a la prueba de referencia, asumiendo sus errores o imprecisiones.

En el diagnóstico de enfermedades, y en especial de algunas parasitarias, este aspecto resulta clave: las técnicas de referencia más empleadas son las copromicroscópicas y la necropsia. Ya se ha abundado en lo *tardío* del diagnóstico coprológico, que pone de manifiesto la existencia de formas parasitarias adultas que eliminan huevos/larvas en las heces, por lo que cualquier intento de establecer la precocidad del ELISA de este modo resulta estéril. Otra conclusión que se infiere

de esta comparación es que *no siempre* se debe esperar una elevada correlación entre ambas técnicas dado que *indican* aspectos diferentes.

Parecería, por tanto, que la necropsia se convierte en el *gold standard* ideal que debería emplearse siempre. Sin embargo, de nuevo es preciso aludir a las fases intraorgánicas de diferentes parásitos, de modo que en función de su ciclo endógeno, en la necropsia podríamos encontrar fases juveniles, maduras, o ambas, que dificultaría la comparación de los resultados con los obtenidos con procedimientos inmunológicos.

1.4.7. Problemática de la aplicación de las técnicas inmunológicas

El principal problema de la aplicación de procedimientos inmunológicos para la detección de anticuerpos específicos estriba en la obtención de antígenos y en la interpretación de los resultados obtenidos. El enzimoimmunoensayo constituyó al principio toda una revolución de los procedimientos de diagnóstico de enfermedades, porque aportaba información muy útil, y el desarrollo de la técnica era sencillo, permitía el procesamiento simultáneo de un número elevado de muestras, el coste de reactivos no era excesivo, y se podía automatizar, lo que supuso una reducción notable del coste de los análisis. Pese a todo, anteriormente se citó el impedimento que supone la obtención de antígenos mediante la recolección de formas parasitarias de animales sacrificados en matadero.

Al tratarse de una técnica colorimétrica, se asoció presencia de color con enfermedad, en base a que la presencia de anticuerpos frente a antígenos parasitarios reflejaba la infección activa de los animales. Este razonamiento se llevó más lejos, e incluso se pretendió llegar a determinar la intensidad de la carga parasitaria en relación con los valores de densidad óptica.

Sin embargo, después de varios años de utilización de estas técnicas, se ha llegado a la conclusión de que a) positividad mediante estas técnicas (color) no indica enfermedad, b) existe reacción incluso en animales sanos que nunca han tenido posibilidad de entrar en contacto con los parásitos o sus antígenos, y c) en la mayoría de los casos la detección de seropositividad se correlaciona con una exposición previa de los animales.

Por este motivo han sido necesarios algunos *ajustes* en la interpretación de los resultados. En **primer lugar**, y como ya se ha mencionado anteriormente, establecer cuándo (valor) un resultado es positivo o no. En el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas de tipo ELISA, los valores de absorbancia se comportan como una variable continua, y no se dan situaciones en las que en las muestras de animales sanos el valor obtenido de absorbancia es cero. El establecimiento del punto de corte resulta esencial en la fiabilidad de los resultados, para lo cual se han establecido diferentes procedimientos ya mencionados.

La detección de anticuerpos frente a los antígenos de diferentes formas parasitarias, aunque supone un gran avance en el diagnóstico y control de un gran número de enfermedades, no siempre se puede correlacionar con la infección activa, y la información aportada sólo indica la exposición previa a los parásitos (Sánchez-Andrade *et al.*, 2002; Kania y Reinemeyer, 2005).

En **segundo lugar**, la administración de tratamientos farmacológicos conlleva (así se espera) la supresión de las formas parasitarias en los animales, que se refleja en muchas especies en la ausencia de eliminación de huevos, larvas, etc. Este razonamiento no es aplicable a las técnicas serológicas, puesto que al estar basadas en el estudio de la respuesta que se induce en el hospedador, no tiene sentido considerar que los anticuerpos *desaparecen*, y por ello los valores de absorbancias alcanzan valor cero. Esto ha sugerido, en opinión de algunos investigadores, que estas pruebas no son útiles para evaluar la eficacia de tratamientos antiparasitarios.

Realmente, parecería más útil establecer un porcentaje de reducción de los valores de densidades ópticas, que guardase relación con la eficacia de la terapia administrada, y que obviamente no alcanzaría el 100% como sucede con las pruebas copromicroscópicas.

En **tercer lugar**, el descubrimiento de la *inmunidad cruzada* que se establece frente a diferentes familias o grupos parasitarios dificulta la interpretación de los resultados en algunos casos, puesto que existen dudas acerca del agente etiológico que estimula la síntesis de anticuerpos en los animales infectados (Romasanta *et al.*, 2003).

Todos estos puntos han de tenerse en cuenta a la hora de aplicar técnicas inmunológicas e intentar llegar a conclusiones fundamentadas. Entre las posibles soluciones a estos problemas destacaríamos, por su utilidad, la producción de antígenos recombinantes unitarios (Hillyer, 1999). Además de permitir la obtención de las cantidades adecuadas en los instantes requeridos, presenta la ventaja de que SIEMPRE se trata del mismo producto, lo que confiere ventajas sustanciales para extender su empleo, y con ello la estandarización de los resultados de diferentes laboratorios en diversos países. Si en la fase de selección de clones responsables de la síntesis de antígenos recombinantes se tiene en cuenta la posible reacción cruzada con otros parásitos, este aspecto quedaría también solucionado.

Con los recientes *adelantos* en la determinación del punto de corte, en especial de las curvas ROC, se consigue una visión objetiva de las diferentes situaciones posibles, que hace posible la selección del valor más adecuado a cada situación.

Finalmente, reiterar la necesidad de estudiar de forma detallada la evolución de la dinámica de anticuerpos tras la administración de tratamientos farmacológicos, porque podría resultar en el acuerdo de unos porcentajes de reducción que sirvan de referencia para dirimir su eficacia, como se ha intentado realizar en las técnicas copromicroscópicas por ejemplo con el FECRT (*fecal egg count reduction test*) (Francisco et al., 2011b).

1.5. APLICACIÓN DE PRUEBAS INMUNOLÓGICAS AL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES PARASITARIAS EQUINAS

Pese a que no se encuentra muy extendida la utilización de pruebas inmunológicas al diagnóstico de infecciones parasitarias en caballos, algunos estudios han destacado que suponen prácticamente el único procedimiento útil, puesto que unas no cursan con signos evidentes, y en otras no se eliminan formas parasitarias a través de las excreciones de los hospedadores.

Protozoos

Un ejemplo de estas situaciones lo podemos encontrar en los caballos afectados por *Sarcocystis neurona*, en los que el diagnóstico clínico es farragoso salvo en aquellos casos harto evidentes

(ataxia). Para el diagnóstico de toxoplasmosis y neosporosis se emplean pruebas de aglutinación en látex, con taquizoítos conservados en formalina y mercaptoetanol, e inmunofluorescencia indirecta (Pitel *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2002).

El diagnóstico laboratorial de **mieloencefalitis protozoaria equina** se realiza mediante la valoración de la respuesta inmunitaria humoral del caballo sospechoso frente a *Sarcocystis* con la técnica de inmunoelectrotransferencia o *immunoblot*, que consiste en el análisis de la presencia de anticuerpos frente a diferentes proteínas del parásito que previamente han sido separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Yeargan y Howe, 2011). En concreto, se ha demostrado la utilidad de 3 proteínas obtenidas a partir del cultivo de merozoítos de *S. neurona* en medios celulares, de 13, 11'5 y 10'5 kDa, para demostrar la presencia de infección activa. Sin embargo, algunos estudios afirman que no existe evidencia entre la presencia de anticuerpos frente a *Sarcocystis* y el desarrollo de la enfermedad (Hoane *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2012a).

En la actualidad, mediante técnicas de Biología Molecular, se han caracterizado genes de diferentes parásitos que codifican antígenos específicos, cuya expresión en un sistema heterólogo permite la obtención de antígenos unitarios en cantidad suficiente. Empleando estas técnicas se han obtenido antígenos de superficie (SnSAG4) y proteínas recombinantes (NhSAG1) de *Neospora* y *Sarcocystis* que han sido aplicados para el desarrollo de una prueba comercial ELISA de detección de anticuerpos frente a estos parásitos (Dangoudoubiyam *et al.*, 2011).

Mediante un enzimoimmunoensayo y el antígeno MHOM/FR78/LEM 75, se ha demostrado que los equinos del Noreste de España están expuestos a la infección por *Leishmania infantum* (Fernández-Bellón *et al.*, 2006)

Los caballos parasitados por **piroplásmidos** no presentan signos evidentes a excepción de infecciones muy intensas, que se pueden diagnosticar por frotis sanguíneo. Las técnicas inmunoenzimáticas se han aplicado con éxito al diagnóstico de *Babesia* o *Theileria*, empleando antígenos obtenidos de merozoítos, o proteínas recombinantes como la proteína de 48 kDa rBc48 para *B. caballi* (Huang *et al.*, 2006; Terkawi *et al.*, 2012).

Trematodos

Aunque no existen demasiados estudios acerca de las trematodosis equinas, se ha demostrado en infecciones experimentales que sólo el 25% de los caballos infectados de forma experimental llegan a eliminar huevos en heces (Soulé et al., 1989), lo que corrobora la hipótesis previa acerca de que los equinos presentan una elevada resistencia al establecimiento de infecciones por trematodos *Fasciola hepatica* (Nansen et al., 1974).

A pesar de estas apreciaciones, la aplicación de técnicas inmunológicas al diagnóstico de trematodos en caballos es escasa, y se limitan a la fasciolosis. En infecciones experimentales se demostró mediante ELISA que los anticuerpos aparecían a las 3-6 semanas post-infección y alcanzaban los valores máximos a las 10-17 semanas (Soulé et al., 1989).

Investigaciones desarrolladas en caballos del noroeste de España con un inmunoensayo y una proteína recombinante (FhrAPS) mostraron que el 60% tenían anticuerpos frente a *F. hepatica* (Arias et al., 2012b).

Resulta interesante por novedosa la aplicación de un ELISA con antígenos de excreción/secreción de *Dicrocoelium* spp. para la detección de exposición a este trematodo en caballos de Puerto de Santa María (Cádiz), que presentaban signos clínicos como estasis biliar, incremento de la actividad de transaminasas hepáticas, cólico (Arias et al., 2012c).

Cestodos

Se han desarrollado investigaciones basadas en la obtención de antígenos de diferentes formas parasitarias. De la comparación de los productos metabólicos y somáticos de adultos de *Anoplocephala perfoliata*, se concluyó que sólo los de excreción/secreción eran útiles para el diagnóstico de **cestodosis equinas** (Höglund et al., 1995), llegándose a alcanzar una sensibilidad del 68% y especificidad del 95% (Proudman y Trees, 1996a).

En base a los resultados obtenidos, en algunas experiencias se ha optado por purificar los antígenos parasitarios, en aras de perfeccionar las técnicas inmunoenzimáticas orientadas a la búsqueda de anticuerpos. De este modo, se aisló una proteína de 12/13 kDa de los antígenos de

excreción/secreción de *A. perfoliata*, y se estableció que si las densidades ópticas eran superiores a 0'6 existía infección activa en los equinos (Trotz-Williams et al., 2008; Getachew et al., 2012). En algunos trabajos se ha demostrado que con esta técnica es posible estimar el número aproximado de cestodos adultos en función de las densidades ópticas obtenidas mediante ELISA (Morgan et al., 2005), destacándose que este procedimiento resulta adecuado en caballos con elevada carga parasitaria y por ello en riesgo de enfermedad (Skotarek et al., 2010).

Nematodos

Las técnicas inmunoenzimáticas también se han aplicado al estudio de la respuesta inmunitaria en caballos frente a **ciatostominos**, comprobándose mediante antígenos de excreción/secreción que los anticuerpos disminuyen a las 6 semanas después de la infección de los equinos (Kara, 1996).

Se ha comprobado que el diagnóstico de ciatostominosis larvaria se puede realizar con ELISA y 2 proteínas de 20 y 25 kDa obtenidas de los antígenos somáticos de dichas larvas (Dowdall et al., 2003, 2004). De este modo, se consigue apreciar un incremento en la respuesta inmunitaria IgG total a las 5-7 s.p.i., que se correlaciona con la presencia de infección activa en los équidos.

Para hacer posible el diagnóstico de ciatostominosis larvaria equina, se ha expresado una proteína recombinante de 25'6 kDa cuya utilidad ha sido demostrada en técnicas ELISA (McWilliam et al., 2010).

Tras fraccionar los antígenos de excreción/secreción de larvas 3 de ciatostominos en un sistema de cromatografía líquida a baja presión (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*), se purificaron 3 complejos proteicos de 51, 29 y 15 kDa con los que se obtuvieron valores elevados (>90%) para la sensibilidad y especificidad, demostrándose asimismo un incremento significativo de las absorbancias 4 semanas antes de la aparición de huevos en las heces (Paz-Silva et al., 2011a).

El análisis de muestras séricas de caballos en Venezuela reveló la presencia de anticuerpos frente a *Trichinella* spp., resultado confirmado mediante PCR. Por el contrario, tras el procesamiento de muestras de músculos mediante digestión artificial no se observaron larvas del nematodo (Viveros et al., 2001).

Miasis

El diagnóstico de las miasis equinas también constituye otro ejemplo de aplicación de técnicas serológicas, precisamente por la imposibilidad de aplicar procedimientos más comunes como los coprológicos. El diagnóstico de gasterofilosis equina se ha mejorado considerablemente con la puesta a punto de una prueba ELISA y antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus intestinalis* y *G. nasalis*, que parece idónea para la estimación de la seroprevalencia de esta miasis *in vivo* (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010).

Continuando con esta línea de investigación basada en la obtención de antígenos de excreción/secreción de larvas 2, se ha procedido a la utilización de los productos de *Rhinoestrus* spp. para el estudio de la cronobiología y epidemiología de esta miasis nasal en caballos de la isla de Cerdeña (Italia) (Mula *et al.*, 2013), pese a que previamente se defendió la purificación de antígenos somáticos y de las glándulas salivares de las larvas 3 (Milillo *et al.*, 2010).





2. Unidad temática



El cuidado de los animales conlleva no sólo su correcta alimentación, sino asegurar su bienestar, procurando que su estado de salud sea el óptimo. Prácticamente desde que se tiene conocimiento de la existencia de las diferentes especies animales, concurre la certeza de que numerosos parasitismos pueden afectar a su estado sanitario, su comportamiento, realización de actividades productivas, y en general limitar su bienestar.

Siempre se ha enunciado que el diagnóstico correcto de los parasitismos constituye un eslabón fundamental para su control, proporcionando la información necesaria para el tratamiento farmacológico y para la instauración de medidas preventivas eficaces. También se suele partir de la premisa de que en general las infecciones parasitarias dependen notablemente del tipo de manejo de los animales, prestándose poca atención a factores intrínsecos como *raza*, *sexo* o *edad*.

En la creencia de que la mayoría de los parasitismos, y los más patógenos, están provocados por helmintos gastrointestinales, las técnicas de diagnóstico más frecuentemente empleadas son las copromicroscópicas, que permiten la observación de ooquistes, huevos, proglotis e incluso larvas de los parásitos. Por este motivo, se desarrolló un **primer ensayo** que consistió en **establecer las principales helmintosis parasitarias del ganado equino mantenido en una zona con clima oceánico (NO España)**. Con este propósito, se recogieron muestras de heces de 418 caballos, que se analizaron mediante las técnicas copromicroscópicas de flotación, sedimentación, migración larvaria y coprocultivos.

Los resultados obtenidos mediante pruebas coprológicas son de indudable interés y utilidad, ya que se correlacionan con la existencia de formas parasitarias adultas, sobre todo en el aparato digestivo y respiratorio de los hospedadores. Sin embargo, existen algunos parásitos que no son eliminados de forma rutinaria a través de las heces, como sucede con *Rhinoestrus* spp. o *Gasterophilus* spp., responsables de miasis en équidos. Esto supone un inconveniente, que hace más complicada la decisión de administrar tratamientos farmacológicos eficaces puesto que no se puede esclarecer qué caballos lo precisan, y en qué época aplicarlos.

Ante esta situación, es preciso recurrir a otras técnicas de diagnóstico que no se basen en la observación de estadios parasitarios en las heces, y que aporten información fidedigna acerca de la infección en los caballos. Los procedimientos inmunoenzimáticos parecen ajustarse a estos planteamientos, puesto que se orientan al estudio de la respuesta inmunitaria humoral que se desarrolla en los hospedadores cuando entran en contacto (exposición) con agentes parasitarios o con sus antígenos.

De acuerdo con estas reflexiones, se diseñó y llevó a cabo un **segundo estudio** para **constatar la utilidad de un inmunoensayo con antígenos de excreción/secreción de *Gasterophilus* spp**, analizar las posibilidades del diagnóstico de infección en caballos de Galicia, determinar la seroprevalencia de esta miasis, y para analizar qué épocas resultan más adecuadas para la administración de antiparasitarios. Para ello, se realizaron dos experimentos: en el primero, durante un año se tomaron (mensualmente) muestras de sangre de un rebaño de 25 caballos, y se examinó su pelaje para comprobar la presencia de huevos de *Gasterophilus*. En el segundo se recogieron muestras sanguíneas de 398 equinos. Se prepararon antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *G. intestinalis* y *G. nasalis*, que se utilizaron para analizar la respuesta inmunitaria humoral en los sueros mediante un ELISA. También se obtuvieron datos mensuales de los parámetros climáticos más importantes (temperaturas, precipitación, humedad relativa).

La aplicación de pruebas serológicas presenta algunas etapas críticas, y en los enzimoimmunoensayos caseros la principal es la preparación de antígenos útiles para el diagnóstico. El método más sencillo consiste en la visita a mataderos, inspección de órganos y recogida de formas parasitarias. Los preparados antigénicos más específicos son los de excreción/secreción, que como su nombre da a entender se obtienen tras la incubación de formas parasitarias vivas en medio de cultivo líquido, de modo que digieren los nutrientes del medio y liberan diversas sustancias, entre las que se encuentran algunos antígenos.

No todos los productos antigénicos *nativos* son útiles para el diagnóstico de enfermedades parasitarias, y en ocasiones se encuentran serias dificultades para su empleo porque existen componentes proteicos comunes a diversos parásitos, fenómeno que limita la utilidad de las

pruebas serológicas. La *respuesta inmunitaria cruzada* puede reducir notablemente la información obtenida mediante *enzimoinmunoensayo*, por lo que urge solucionar este contratiempo. Otro de los problemas que pueden aparecer es el de la precocidad de la detección de la infección, dado que a veces la detección de anticuerpos no rebaja el *periodo de prepatencia* o de aparición de formas parasitarias en las heces.

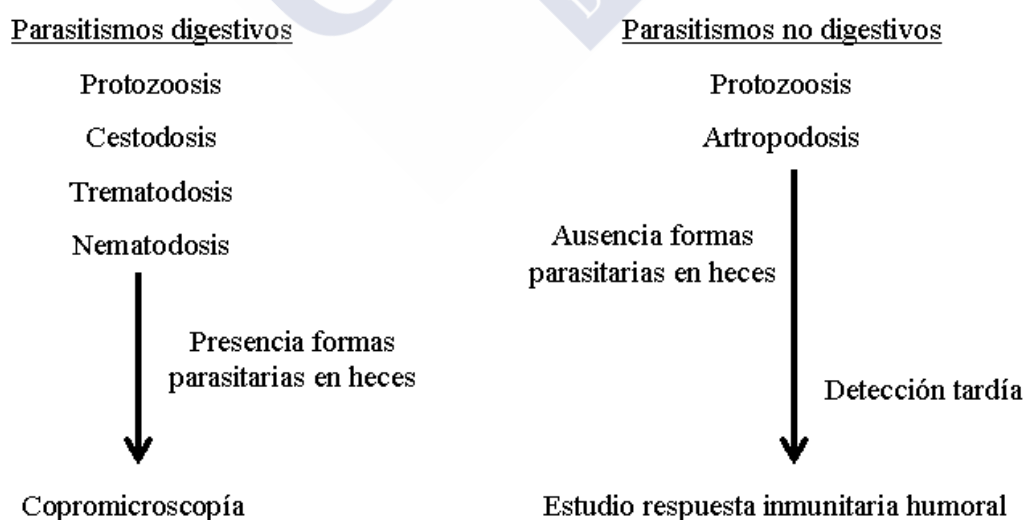
Para solucionar estas cuestiones, una de las opciones más asequibles consiste en la purificación de los antígenos con algunos procedimientos de cromatografía líquida, como FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), debido a las excelentes posibilidades de estandarización y automatización que ofrece este sistema. En el **tercer ensayo** se propuso la **purificación de antígenos de excreción/secreción de larvas 3 de ciatostominos**, que se emplearon en el estudio de la respuesta serológica IgG de caballos con ciatostominosis natural. En una primera actividad se determinó la idoneidad de los antígenos purificados con sueros de potros de 3-4 meses de edad, y en la segunda se evaluó la cinética de anticuerpos en otro rebaño de potros de 3 meses.

La obtención de antígenos parasitarios depende en numerosos casos del acceso a órganos de animales infectados, de los que como se ha mencionado con anterioridad se tomarían los ejemplares de parásitos. Esta manera de proceder constituye un notable hándicap, puesto que sólo sería posible preparar productos de algunos parásitos, especialmente de los que afectan con mayor frecuencia a los animales que se sacrifican en los mataderos visitados. Además de suponer una reducción geográfica importante, también hay que considerar que el grado de parasitación sea elevado, para así recoger un número suficiente de parásitos con los que obtener una cantidad importante de antígenos. Otro inconveniente estriba en el tamaño de algunas formas parasitarias (protozoos), que forman quiste microscópicos imposibles de detectar en la cadena de sacrificio. Esta dependencia tan marcada de la presencia de los parásitos en el preciso momento en que se acude a los mataderos contribuye a reducir el empleo de técnicas inmunoenzimáticas, salvo que se empleen kits disponibles comercialmente.

Desde hace algunas décadas se ha incrementado el transporte de caballos entre países de diferentes continentes, bien para participar en competiciones deportivas, bien fruto de transacciones económicas de ejemplares de elevado valor económico. Ante esta perspectiva,

existe riesgo de transmisión de enfermedades. Un caso interesante es el de las mieloencefalitis protozoarias, provocadas por *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona* o *Neospora hughesi*. La zarigüeya (*Didelphis spp.*) es el único hospedador definitivo conocido de *S. neurona*, y sólo se encuentra en América, por lo que su presencia está reducida a este continente. La infección por *S. neurona* puede provocar a los caballos graves trastornos nerviosos, y su diagnóstico no se puede realizar por métodos copromicroscópicos debido a la localización de los parásitos en el Sistema Nervioso Central. Empleando pruebas de inmunofluorescencia indirecta se han encontrado en Francia caballos con anticuerpos frente a *S. neurona*.

Mediante técnicas de Biología Molecular se han desarrollado procedimientos que permiten la expresión de proteínas recombinantes en cepas de bacterias completamente tipificadas. Esta parece ser la vía más adecuada para asegurar la obtención de antígenos unitarios en el momento preciso y en la cantidad requerida. Como se trata de productos unitarios, se favorece la posibilidad de estandarizar y comparar los resultados de diferentes laboratorios por todo el mundo. Por estas razones, y teniendo en cuenta el incremento del número de caballos que son desplazados a diferentes países para participar en eventos deportivos, se llevó a cabo un **cuarto estudio** en el que se **evaluó el riesgo de exposición en los caballos del noroeste de España a *S. neurona***. Para ello, se recogieron muestras de sangre de 384 caballos del Noroeste de España, que se enfrentaron a varias proteínas recombinantes del protozoo con una prueba de inmunoelectrotransferencia y un ELISA.



Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, se ha planteado un estudio con los siguientes

OBJETIVOS:

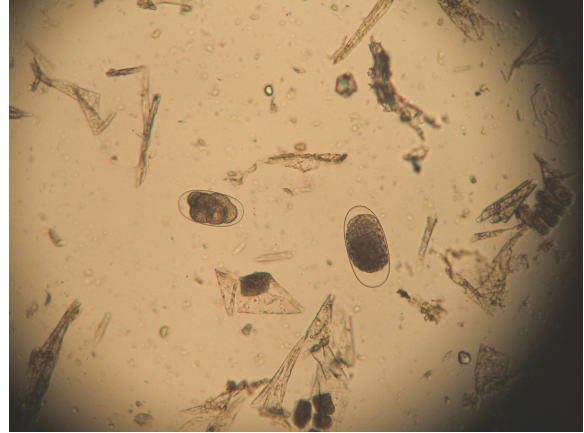
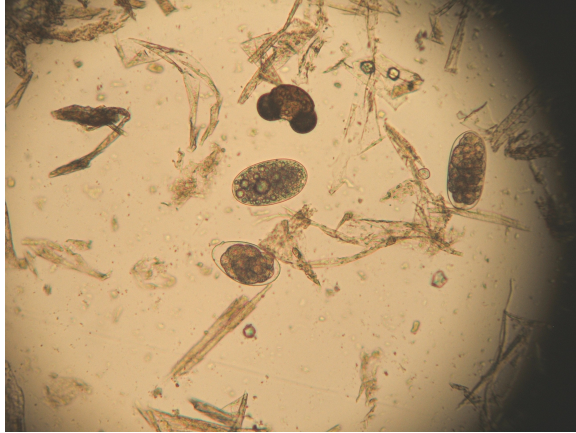
- 1.- Determinar las principales helmintosis parasitarias en caballos del Noroeste de España.
- 2.- Establecer la utilidad de un enzimoimmunoensayo para la detección de exposición a *Gasterophilus* spp. y señalar qué épocas resultan más adecuadas para la administración de un tratamiento farmacológico.
- 3.- Analizar la conveniencia de purificar antígenos de excreción/secreción de larvas 3 de ciatostominos para mejorar el diagnóstico de estas nematodosis.
- 4.- Precisar el riesgo de exposición de caballos a *Sarcocystis neurona*, agente responsable de mieloencefalitis protozoaria equina.



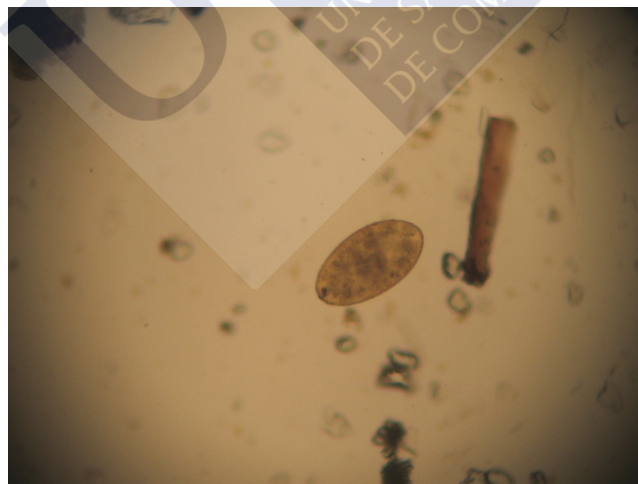


3. Publicaciones





Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under an oceanic climate area (NW Spain). (2009). FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., DACAL, V., SUÁREZ, J.L., URIARTE, J., MORRONGO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. **Journal of Parasitology Research**, Article ID 616173, 5 pages doi:10.1155/2009/616173





Research Article

Intrinsic Factors Influencing the Infection by Helminth Parasites in Horses under an Oceanic Climate Area (NW Spain)

I. Francisco,¹ M. Arias,¹ E. J. Cortiñas,¹ R. Francisco,¹ E. Mochales,¹ V. Dacal,¹ J. L. Suárez,¹ J. Uriarte,² P. Morrondo,¹ R. Sánchez-Andrade,¹ P. Díez-Baños,¹ and A. Paz-Silva¹

¹Animal Pathology Department, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela, 27002-Lugo, Spain

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Animal Health Division, Avda. Montaña, 930 50059 Zaragoza, Spain

Correspondence should be addressed to A. Paz-Silva, adolfo.paz@usc.es

Received 9 January 2009; Accepted 4 March 2009

Recommended by Benjamin M. Rosenthal

A coprological survey to determine the influence of some intrinsic factors (breed, age, and sex) on the infection by helminth parasites in equine livestock ($n = 418$) under an oceanic climate area (NW Spain) was conducted. Faecal samples were individually collected and analyzed by the coprological techniques. The main strongylid genera identified were *Trichonema* and *Cyalocephalus* spp (small strongyles) and *Strongylus* and *Triodontophorus* (large strongyles). The prevalence of gastrointestinal nematode was 89% (95% CI 86, 92) and 1% cestoda (0, 2). The percentage of horses with strongyloid parasites was 89% (86, 92), 11% (8, 14) for *Parascaris*, and 3% (1, 5) for *Oxyuris*. The highest prevalence for ascariasis was observed in the youngest horses (<3 years), for oxyuriasis in the >10 years animals, and for strongylosis in the 3–10 years ones. Females were significantly more parasitized than males. A negative correlation between the age and the egg-excretion of ascarids and strongyles was recorded. The autochthonous and the English Pure Blood horses were the most parasitized. We concluded that the infections by helminths, especially the strongyloids, are significantly common in the region, so that greater importance should be given to this situation.

Copyright © 2009 I. Francisco et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

The horse industry is increasing because of its diversity, and involves business, sport, gaming, entertainment, or recreation. The raising of horses plays a significant role, due to the high number of animals for leisure, which has generated several direct jobs, such as those needed for handling and the sanity of the animals.

Nowadays, horses are being used in wild pastures and countries for the forest management, utilizing unwanted vegetation for production. For this reason, this industry deserves the attention of the general public and the governments also. This new situation requires more information about the sanitary status of these animals, and the appropriate measures for ensuring the horses are in an adequate fitness condition. Among the diseases affecting horses, helminth infections are much extended [1].

An oceanic climate (also called marine west coast climate and maritime climate) is the climate typically found along

the west coasts at the middle latitudes of all the world's continents and in southeastern Australia. Oceanic climates are characterized by a narrower annual range of temperatures than are encountered in other places at a comparable latitude and do not have the extremely dry summers of Mediterranean climates. Under those conditions, survival of parasitology resistant forms is enhanced, enabling thus the possibility for infection throughout the year.

Several investigations have shown the effect of some factors on the infection by parasites in horses. Osterman Lind et al. [2] and Larsen et al. [3] observed the highest output of strongyle eggs in animals aged 2–3 years from Sweden. Bucknell et al. [4] reported that in Australia cyathostomes were more prevalent in young horses, and *P. equorum* was found exclusively in horses less than 2 years of age, and the highest mean intensity of infection for *Anoplocephala perfoliata* was in those horses. Lyons et al. [5] obtained similar results in equids from Kentucky (USA).

TABLE 1: Distribution of the fecal samples from horses under an oceanic climate area (NW Spain) according to their breed, sex, and age.

	Female				Male				Total
Breed	Age (years)				Age (years)				Total
	<3	3–10	>10	Total	<3	3–10	>10	Total	
CDE	4	8	7	19	3	4	2	9	28
PRE	1	6	5	12	3	2	5	10	22
PSI	15	40	20	75	3	5	0	8	83
PRG	40	129	55	224	16	37	8	61	285
Total	60	183	87	330	25	48	15	88	418

Nevertheless, there is a lack of knowledge about the influence of breed or sex on the infection by helminth parasites in horses from oceanic climate areas.

This study reports the effect of various intrinsic factors (breed, age, sex) on the equine infection by helminth parasites. Fecal samples were individually collected from 418 horses in an oceanic climate area (NW Spain) and analyzed by the coprological flotation, sedimentation, and migration techniques. Coprocultures were also done to identify the main strongylid genera affecting the horses.

2. Material and Methods

2.1. Horses. Between April and September 2007, fecal samples from the rectum of 418 horses from NW Spain were collected. According to the breed, four groups were established (Table 1): Spanish Sport Horse (SSH), Spanish Pure Breed (SPB), English Pure Breed (EPB) and the autochthonous Pura Raza Galega (PRG). By considering the age, horses were divided into three groups: G-1 (<3 years old), G-2 (3–10), and G-3 (>10) (Table 1).

2.2. Study Design. Although some interesting information about horses management as hygienic conditions, treatment history, and so forth would be helpful to explain the results, it was not possible to achieve in many cases, so we decided not to include it in the current paper. Many samples were collected from horses under an extensive management, and ask those questions to the owners was not possible.

For that reason, the impossibility for ensuring the collection of all data belonging to the total population limited us to the analysis of the factors possibly involved in the infection of equines by helminth parasites. The factors we analyzed corresponded to parameters which can be observed and measured for us in all cases.

The influence of climatic conditions on the dynamics of egg expulsion has been reported [6]. Nevertheless, by considering that the main goal in the current work was to gain more information about the presence of helminth infection in horses and the difficulty in taking more than one fecal sample from each animal in several cases, the data presented here must be comprehended as a coprological survey.

2.3. Coprological Analysis. The observation of parasitic forms in the feces of the horses was evaluated by using the coprological flotation, sedimentation, and migration techniques [7]. Five grams of each fecal sample were processed (in duplicate) by the flotation, sedimentation, and migratory techniques [8], with a sensitivity of 10 eggs per gram of feces (EPG).

The laboratory technician conducting the microscope analysis was also blinded to the study design of the selection of the stool specimens.

2.4. Genera Identification. Since it is not possible to distinguish strongyle eggs of different species morphologically, fecal samples are cultured for 10–14 days at 20–25°C to allow the development of L3s, which may be collected by means of the Baermann procedure [6, 9]. Genera were identified according to Lichtenfels [10].

2.5. Statistical Analysis. By taking account that the egg elimination is not normally distributed, statistical analysis was done by means of the nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* two-sided tests ($\alpha = 0.05$), and significant differences were considered when $p < .05$. The descriptive parameters were the EPG quartiles 1, 2, and 3. All tests were done using SPSS for Windows (14.1).

Prevalences were expressed as the percentage and the 95% Confidence Interval (CI).

The existence of correlation among the different parameters was assessed by using nonparametric Spearman's rank correlation test.

3. Results

3.1. Identification of Helminth Parasites. Eggs from gastrointestinal nematoda and cestoda were observed in the feces of the horses. No eggs from trematoda or lungworm larvae were obtained.

The analysis of the gastrointestinal eggs showed that the horses were parasitized by *Parascaris equorum*, Strongyles, and *Oxyuris equi*. By means of the coprocultures, we identified *Cyathostominae* and *Gyalocephalus* spp (small strongyles) and *Strongylus* and *Triodontophorus* (large strongyles).

No differences in the genera of strongyles identified according to breed, age, or sex were recorded.

3.2. Prevalence of Helminth Parasites. Eighty nine percent (95% CI 86, 92) of the samples had gastrointestinal eggs and 1% (0, 2) cestoda. The prevalence of horses passing *Parascaris* eggs by feces was 11% (8, 14), 88% (85, 91) strongyles, and 3% (1, 5) oxyurids.

As drawn in Table 2, the highest prevalence of parascariosis was obtained in the youngest animals, English Pure Blood horses and females. No *Parascaris* eggs were observed in Sport Spanish Horse animals. Significant differences were obtained by considering the age, breed, and sex of the animals.

The prevalence of strongyles was higher in G-1 and G-2, horses belonging to the autochthonous PRG breed and

TABLE 2: Prevalences of helminth parasites in 418 horses from an oceanic climate area (NW Spain). Results are expressed as the percentage and the 95% Confidence Interval (CI). Spanish Sport Horse (SSH), Spanish Pure Breed (SPB), English Pure Breed (EPB), autochthonous Pura Raza Galega (PRG).

		Ascarids	Strongyles	Oxyurids	Cestoda
Age	<3	22 (18, 26)	93 (90, 96)	1 (0, 2)	0
	3–10	6 (4, 8)	91 (88, 94)	2 (1, 3)	2 (1, 3)
	>10	12 (9, 15)	81 (77, 85)	6 (4, 8)	1 (0, 2)
	χ^2	15.842	8.732	5.584	2.228
	p	0.001	0.0013	0.061	0.328
Breed	SSH	0	0	0	0
	SPB	5 (3, 7)	19 (15, 23)	0	0
	EPB	34 (29, 39)	98 (97, 99)	5 (3, 7)	1 (0, 2)
	PRG	5 (3, 7)	100	2 (1, 3)	2 (1, 3)
	χ^2	64.960	366.936	2.87	0.976
	p	0.001	0.001	0.412	0.807
Sex	Male	12 (9, 15)	90 (87, 93)	3 (1, 5)	2 (1, 3)
	Female	2 (1, 3)	84 (80, 88)	0	0
	χ^2	7.244	3.333	2.799	1.508
	p	0.007	0.068	0.094	0.219

females. No positive cases were recorded in the Sport Spanish horses. Significant differences were observed by taking into account the age and the breed of the animals.

Table 2 reflects that the greatest percentage of horses with oxyurids corresponded to the oldest animals (G-3), English Pure Blood, and females. No eggs were observed in males or in SSH animals.

Finally, the highest prevalence of horses passing cestode eggs by feces was obtained in the equids from the G-2 (3–10 years), autochthonous (PRG), and females, although these differences were not significant.

Spearman's rank test showed a statistical negative correlation between the age of the horses and the prevalence of ascarids and strongyles ($r = -0.141$, $p = 0.005$ and $r = -0.143$, $p = 0.004$, resp.). Likewise, a weak and positive correlation between age and prevalence of pinworms was matched ($r = 0.113$, 0.023).

3.3. Intensity of Infection. The results of the egg-excretion are summarized in Table 3. The highest number of *Parascaris* eggs was observed in the foals, autochthonous horses

TABLE 3: Helminth eggs per gram of feces (EPG) in 418 horses from an oceanic climate area (NW Spain). Spanish Sport Horse (SSH), Spanish Pure Breed (SPB), English Pure Breed (EPB); autochthonous Pura Raza Galega (PRG). Results are expressed as EPG quartiles 1, 2, and 3 (Q1, Q2, and Q3, resp.).

		Statistics	Ascarids	Strongyles	Oxyurids	Cestoda
Age	<3	Q1	0	100	350	
		Q2	50	400	350	
		Q3	137	775	350	
	3–10	Q1	0	100	112	50
		Q2	0	380	150	50
		Q3	50	750	3225	150
Breed	>10	Q1	0	100	100	50
		Q2	0	200	100	50
		Q3	50	500	325	50
	χ^2	14.781	10.500	1.560	0.2	
	p	0.001	0.005	0.458	0.655	
Sex	Male	Q1				
		Q2				
		Q3				
	Female	Q1		25		
		Q2		50		
		Q3		725		
Breed	SSH	Q1	0	413	100	50
		Q2	0	650	150	50
		Q3	50	1275	150	50
	SPB	Q1	0	100	100	50
		Q2	0	300	225	50
		Q3	100	700	1362	150
Sex	PRG	χ^2	3.450	148.841	0.165	0.2
		p	0.327	0.001	0.684	0.655
	Male	Q1		50		
		Q2		150		
		Q3		600		
Breed	Female	Q1	0	100	100	50
		Q2	0	351	150	50
		Q3	50	750	375	100
	χ^2	0.364	7.942			
	p	0.546	0.005			

(PRG), and males. The Kruskal-Wallis test showed significant differences according to the age of the animals.

As drawing in Table 3, there were reached differences in the egg excretion of small strongyles regarding the breed and sex of the horses. The greatest numbers were observed in the English Pure Blood animals and in females, whereas no elimination was observed in Spanish Sport Horses.

No differences were obtained in the egg elimination of oxyurids and cestoda by considering the age, breed, or sex of the horses.

- of a single anthelmintic treatment of Danish horses," *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 43, no. 2, pp. 99–106, 2002.
- [4] D. G. Bucknell, R. B. Gasser, and I. Beveridge, "The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia," *International Journal for Parasitology*, vol. 25, no. 6, pp. 711–724, 1995.
- [5] E. T. Lyons, S. C. Tolliver, and S. S. Collins, "Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966," *Parasitology Research*, vol. 99, no. 2, pp. 114–118, 2006.
- [6] T. A. Kuzmina, Y. I. Kuzmin, and V. A. Kharchenko, "Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine," *Veterinary Parasitology*, vol. 141, no. 3-4, pp. 264–272, 2006.
- [7] R. P. Herd, "Performing equine faecal egg counts," *Veterinary Medicine*, vol. 87, pp. 240–244, 1992.
- [8] MAFF, *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, HMSO, London, UK, 1986.
- [9] E. Osterman, *Prevalence and control of strongyle nematode infections of horses in Sweden*, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2005.
- [10] J. R. Lichtenfels, "Helminths of domestic equids: illustrated keys to genera and species with emphasis on North American forms," *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, vol. 42, pp. 1–92, 1975.
- [11] J. E. Hodgkinson, "Molecular diagnosis and equine parasitology," *Veterinary Parasitology*, vol. 136, no. 2, pp. 109–116, 2006.
- [12] B. O'Meara and G. Mulcahy, "A survey of helminth control practices in equine establishments in Ireland," *Veterinary Parasitology*, vol. 109, no. 1-2, pp. 101–110, 2002.
- [13] K. Romaniuk, K. Reszka, and E. Lasota, "Influence of animal breeding manner on the occurrence of internal parasites," *Wiadomości Parazytologiczne*, vol. 50, no. 3, pp. 647–651, 2004.
- [14] S. Love, D. Murphy, and D. Mellor, "Pathogenicity of cyathostome infection," *Veterinary Parasitology*, vol. 85, no. 2-3, pp. 113–122, 1999.
- [15] E. T. Lyons, T. W. Swerczek, S. C. Tolliver, H. D. Bair, J. H. Drudge, and L. E. Ennis, "Prevalence of selected species of internal parasites in equids at necropsy in central Kentucky (1995–1999)," *Veterinary Parasitology*, vol. 92, no. 1, pp. 51–62, 2000.
- [16] C. J. Proudman and G. B. Edwards, "Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis," *Veterinary Record*, vol. 131, no. 4, pp. 71–72, 1992.
- [17] A. Meana, M. Luzon, J. Corchero, and M. Gómez-Bautista, "Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection," *Veterinary Parasitology*, vol. 74, no. 1, pp. 79–83, 1998.
- [18] M. W. Mfitlodze and G. W. Hutchinson, "Prevalence and intensity of non-strongyle intestinal parasites of horses in northern Queensland," *Australian Veterinary Journal*, vol. 66, no. 1, pp. 23–26, 1989.
- [19] C. Collobert-Laugier, H. Hoste, C. Sevin, C. Chartier, and P. Dorchies, "Mast cell and eosinophil mucosal responses in the large intestine of horses naturally infected with cyathostomes," *Veterinary Parasitology*, vol. 107, no. 3, pp. 251–264, 2002.
- [20] T. R. Klei and M. R. Chapman, "Immunity in equine cyathostome infections," *Veterinary Parasitology*, vol. 85, no. 2-3, pp. 123–136, 1999.
- [21] R. Fikru, D. Reta, and M. Bizunesh, "Prevalence of equine gastrointestinal parasites in western high lands of Oromia, Ethiopia," *Bulletin of the Animal Health Production in Africa*, vol. 53, no. 3, pp. 161–166, 2005.





A novel 2nd instars *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. (2010). R. SÁNCHEZ-ANDRADE, F.J. CORTIÑAS, I. FRANCISCO, J.A. SÁNCHEZ, P. MULA, C. CAZAPAL, L. VÁZQUEZ, J.L. SUÁREZ, R. FRANCISCO, M.S. ARIAS, P. DÍEZ-BAÑOS, A. SCALA, A. PAZ-SILVA. **Veterinary Parasitology**, 171: 314-320.







Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses

R. Sánchez-Andrade^a, F.J. Cortiñas^a, I. Francisco^a, J.A. Sánchez^a, P. Mula^b,
C. Cazapal^a, L. Vázquez^a, J.L. Suárez^a, R. Francisco^a, M.S. Arias^a, P. Díez-Baños^a,
A. Scala^b, A. Paz-Silva^{a,*}

^a Epidemiology, Parasitology and Zoonoses, Animal Pathology Department, College of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

^b Dipartimento di Biologia Animale, Sezione di Parasitologia e Malattie Parassitarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Sardinia, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2009

Received in revised form 22 March 2010

Accepted 26 March 2010

Keywords:

Gasterophilus

Silvopasturing horses

IgG

Chemotherapy

Excretory/secretory antigens

Chronobiology

ABSTRACT

We have developed a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on excretory/secretory antigens of second instar *Gasterophilus* for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. Between January 2007 and January 2009, two experiments were carried out on free-ranging horses in northwest Spain. During the first year, monthly blood samples were collected from a herd of 25 horses. In the second year, a monthly serological survey was conducted for a total of 398 different horses. All the sera were analyzed by ELISA using excretory/secretory antigens from *Gasterophilus intestinalis* (GphIL2ES) and *Gasterophilus nasalis* second-stage larvae (GphnL2ES). Climatic data were collected between January 2007 and January 2009 from local meteorological automated stations to establish the weather pattern in the study area. Observations of *Gasterophilus* eggs on the horses' hair and third instars passed in the faeces were also done. The kinetics of IgG response decreased against GphIL2ES from January to July, increased slowly from August and rose up to January. After a slight decrease in January, the absorbances against GphnL2ES reduced from April to August, when the lowest values were observed. The IgG values rose until the end of the study in January. Third instars were observed in the faeces in March to May, and *Gasterophilus* eggs were seen on the horses' hair from June to September. The highest IgG seroprevalences were achieved in winter (January–February; 100%) against both antigens. The lowest percentages of seropositivity were observed in June (3%) to the GphIL2ES, and in July (9%) to the GphnL2ES. The use of antigens from *G. intestinalis* second-stage larvae was shown to be suitable for diagnosing infestation by *G. intestinalis* or *G. nasalis*. We concluded that under oceanic climate conditions, the egg-laying period occurs from late spring, and eggs and first instars are found in the mouth in early summer. During summer the second instars move into the stomach and intestine, where the third-stage larvae remain until the end of winter, when pupation takes place. The adult horse bot fly emerges in the spring. Two treatments for the control of gasterophilosis are suggested: a curative in the summer to eliminate the first instars and a preventive in the autumn to suppress the second instars.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Infestation of horses by *Gasterophilus* spp. is very common worldwide. Eggs are deposited by the adult flies during warm seasons when females lay eggs on the horses'

* Corresponding author. Tel.: +34 982285900; fax: +34 982252195.
E-mail address: adolfo.paz@usc.es (A. Paz-Silva).

forelegs, lips, face and the intermandibular area; an exception being female *G. pecorum*, which lay eggs on the grass (Cogley and Cogley, 2000). The first-stage larvae hatch from the eggs and introduced into the mouth, and after a 5-week period they moult to second-stage larvae (Edwards, 1982). Second instars moved to the stomach and intestine, where they moult into third instars, which can remain attached to the stomach and intestine for 8–10 months (Coles and Pearson, 2000).

Gasterophilosis is associated with impaired swallowing, gastrointestinal ulcerations, gut obstructions or volvulus, rectal prolapse, anaemia, diarrhoea, and digestive disorders (Gökçen et al., 2008). High larval burdens have been implicated in gastric ulceration and rupture, intramural gastric suppuration, peritonitis following gastroduodenal perforation, and gastro-oesophageal reflux (Edens and Murray, 1992). Immature *Gasterophilus nasalis* may burrow into the spaces around the teeth and can cause necrosis of the gums (Wall and Shearer, 1991). There are a few reports of human myiasis associated with *Gasterophilus* larvae causing subcutaneous crawling or ophthalmo-myiasis (Royce et al., 1999; Chen, 2001; Anderson, 2005). *Gasterophilus*-associated myiasis has been also described in dogs (Taylor et al., 2002).

Myiasis in horses is commonly detected by the visual inspection of larvae at slaughter. Only three of the eight known *Gasterophilus* species occur in the oceanic climate region of Western Europe: *Gasterophilus intestinalis*, *G. nasalis* and *G. haemorrhoidalis* (Agneessens et al., 1998). Several surveys conducted in horse abattoirs in the United Kingdom (Lyon et al., 2000), France (Bernard et al., 1994) and Italy (Principato, 1989) showed that *G. intestinalis* and *G. nasalis* were the main species present. Other species, including *G. haemorrhoidalis*, *G. inermis* and *G. pecorum*, are seldom reported (Coles and Pearson, 2000; Otranto et al., 2005). Other possibilities for detecting *Gasterophilus* involve the observation of eggs on the hair of the horses or third instars in the

rectum of the horses or in their faeces (Gökçen et al., 2008).

Supplying of horses naturally infested with *Gasterophilus* spp. in slaughter studies is often difficult and expensive, and usually large numbers of animals are necessary before significant data can be obtained (Dawson, 2003). The absence of information on the humoral immunological response to *Gasterophilus* complicates the development of serological studies (Escartín-Peña and Bautista-Garfias, 1993), although the characterization of proteins of *G. intestinalis* second and third instars have recently been reported (Roelfstra et al., 2009).

Management of grazing horses in forests and natural pastures (silvopasturing) is critical for the sustainability of those areas and for lowering fire risks by reducing brush and unwanted and combustible vegetation. Sampling these horses for *Gasterophilus* is difficult as is applying chemotherapy when necessary (Francisco et al., 2009).

In the current study, the presence of IgG antibodies against excretory/secretory antigens from *G. intestinalis* and *G. nasalis* 2nd stage larvae in horses in an oceanic climate area (northwest Spain) was analyzed. The results are discussed together with data from the examination of *Gasterophilus* eggs on the hair of the horses, and third instars passed in faeces.

2. Materials and methods

2.1. Variations on climatic parameters

The current investigation was conducted in an area of 29,574 km² (Galicia, northwest Spain, 43°0'0" N, 8°0'0" W). Data corresponding to maximum and minimum temperatures, rainfall, and relative humidity were obtained monthly from 32 automated meteorological stations to establish the climatic pattern in this region (Fig. 1).

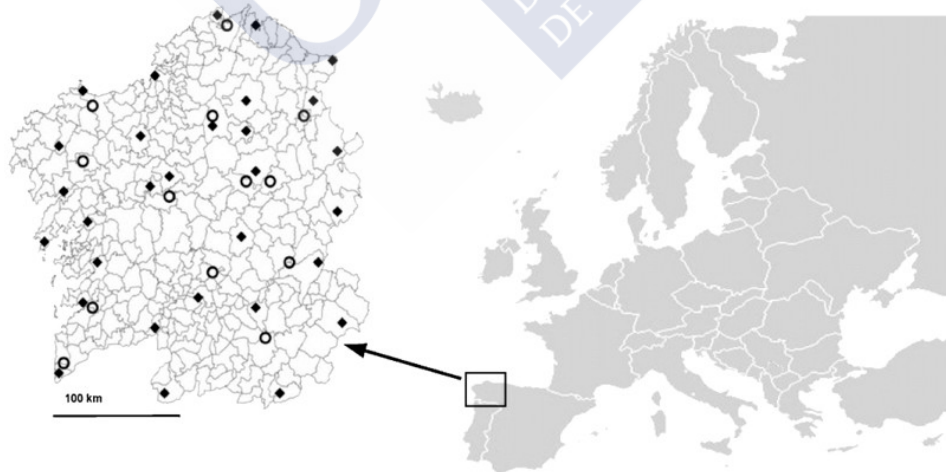


Fig. 1. Distribution of the automated meteorological stations (♦) and the sites where horses were sampled (●). The area of study is located in NW Spain.

2.2. Experimental design

Autochthonous Pura Raza Galega (PRG) horses are maintained under silvopasture, grazing on forested areas with natural pastures characterized by annual grass species, and supplementation is never provided by their owners. Their feeding seems scarce and veterinary attention is seldom given. The main benefit from these equines is reduction of uncontrolled vegetation rather than meat production. Most mares foal between April and June (Francisco et al., 2009). Most of the horses are captured once a year in early summer for branding and for cutting manes and tails to sell. Some of the horses are sold, and the rest are set free to the mountains and natural pastures again.

Between January 2007 and January 2008, blood samples from one group of 25 silvopasturing adult horses were collected monthly. These horses did not receive parasiticide treatment in the year before the beginning of the study or during it. The animals were penned for the sampling.

Examination of the equines' hair was done monthly for visual appraisal of attached bot eggs. Faeces were also examined for the presence of third instars. The classification of the larvae was done according to Zumpt (1965).

From January 2008 to January 2009, blood samples were collected monthly from a total of 398 PRG silvopasturing horses in 13 different areas (Fig. 1). Each horse from each area was sampled only one time. These animals were selected on the condition that no parasiticide treatment had been applied in the year preceding the beginning of this experiment. No parasiticides were administered during the experiment. The number of horses sampled in each farm ranged from 25 to 33.

The humoral immune response of horses against *Gasterophilus* was analyzed by ELISA based on excretory/secretory antigens from *G. intestinalis* and *G. nasalis* second-stage larvae (GphiL2ES and GphnL2ES, respectively).

The use of excretory/secretory antigens followed prior reports of successful use of these antigens (Sánchez-Andrade et al., 2005). Briefly, *Gasterophilus* second and third instars were collected from the stomach and intestine of 60 horses slaughtered at a local abattoir. After washing the larvae in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), they were separated according to developmental stage based on morphological characteristics (Zumpt, 1965).

The second instars were incubated in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) culture medium at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere for 3 days, removing this medium every 8–10 h. Finally the medium was collected, dialyzed exhaustively against water, and lyophilized. The protein concentration was estimated by using a BCA[®] kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

The purified antigen was diluted in PBS (pH 7.4) to a concentration of 2.5 µg/ml to coat the wells of ELISA plates (Costar, Corning Inc., Madrid, Spain). Serum samples were diluted 1:250 in PBS containing 0.05% Tween and 1% skimmed milk, and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-horse IgG (Sigma–Aldrich Co., Madrid, Spain) was used at a 1:2500 dilution. Absorbances were read using a spectrophotometer (Titertek Multiskan, Hämmelina, Sweden) at 492 nm.

Pooled sera from positive and negative horses were added to each plate. Positive sera were taken from 28 horses with 2nd stage larvae in their digestive tracts, and negative sera were collected from 32 equines without *Gasterophilus* larvae. It is noteworthy that horses with positive results always had mixed infestation by the two *Gasterophilus* spp.; monoinfestation was not observed.

The cut-off point was estimated as the mean of the 32 negative sera plus 3 SD (Sánchez-Andrade et al., 2005). The horses were considered as positive when OD was >0.3312 for GphiL2ES and >0.4622 for GphnL2ES.

To validate the ELISA based on the excretory/secretory antigens from both *G. intestinalis* and *G. nasalis* second-stage larvae, the control sera were assayed and estimates of the values for sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios were done according to Thrusfield (2005).

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis of the absorbance was conducted using ANOVA, and differences were considered significant when $P < 0.05$. The Pearson's correlation test was applied to evaluate the existence of correlation among the different variables considered. All tests were performed with the statistical package SPSS, version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

The percentages of seroprevalence were expressed as the true prevalence value and the 95% confidence interval, and analyzed by use of the χ^2 test. Significance was considered when $P < 0.05$.

Given point estimates for sensitivity (se), specificity (sp), and apparent prevalence (AP), the true prevalence was calculated using the following expression (Rogan and Gladen, 1978):

$$\text{True prevalence (TP)} = \frac{(AP + sp - 1)}{(se + sp - 1)}$$

The agreement in the diagnostics among the results achieved with both the GphiL2ES and GphnL2ES antigens, and the observation of *Gasterophilus* larvae in the 60 slaughtered horses was estimated by calculating the kappa value.

3. Results

3.1. Climatic pattern

There were no significant differences between the annual values (2007–2009) for maximum, average and minimum temperature, rainfall and days with rainfall, thus monthly variations are presented as an annual climatic pattern (Fig. 2). The values of rainfall ranged from 0.6 (July) to 16 cm (May), and the number of days with rain coincided with the rainfall data.

Average temperatures were 18 °C in August and 5.3 °C in December. The minimum and maximum temperatures also exhibited this pattern.

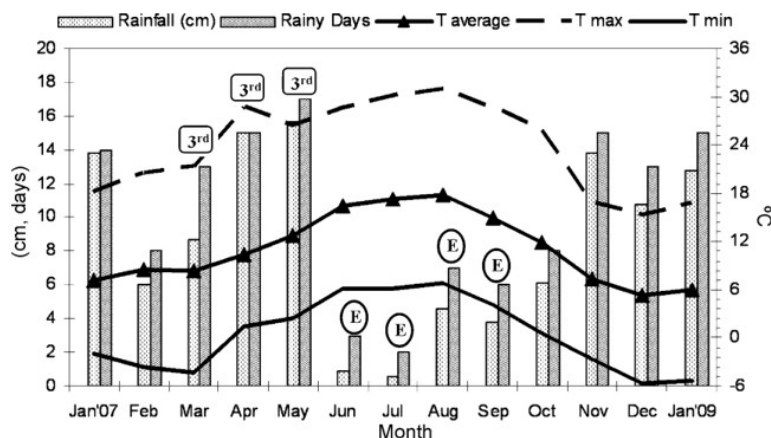


Fig. 2. Climatic pattern in an oceanic climate area at the middle latitudes (40°–60° N). Data result from the combination of the parameters obtained from January 2007 to January 2009. The lines and the bars represent monthly mean values. (3rd): presence of 3rd stage *Gasterophilus* larvae in the faeces of one group of 25 silvopasturing adult horses monthly sampled between January 2007 and January 2008; (E): observation of *Gasterophilus* eggs on the horses' hairs.

3.2. Direct diagnosis

The existence of third instar *Gasterophilus* in faeces occurred in March to May, and *Gasterophilus* eggs were observed from June to September (Figs. 2–4). *G. intestinalis* and *G. nasalis* third instars were collected and identified.

3.3. ELISA validation

For Gphil2ES, the values for the sensitivity and specificity were 89% (81–97%) and 78% (69–87%), respectively, whereas the positive and negative predictive values were 78% (69–87%) and 89% (81–97%), respectively. The positive likelihood ratio was 4.082, and the negative was 0.137. Finally, a 0.668 value for kappa was reached ($P=0.001$).

A comparison between the results of the GphnL2ES ELISA and the necropsy showed 82% (72–92%) sensitivity, 78% (68–88%) specificity, 77% (66–88%) positive predictive value and 83% (73–93%) negative predictive value. The positive likelihood ratio was 3.755 and the negative likelihood ratio was 0.228. The value for kappa was 0.600 ($P=0.001$).

3.4. Immune response to *G. intestinalis* and *G. nasalis*

The IgG curves against Gphil2ES and GphnL2ES are shown in Fig. 3. From January to July, a reduction in the antibody values against Gphil2ES was observed. A slow increase in the values was noted from August, reaching a plateau level in November and rising again up to January. After a slight decrease in January, the absorbances against

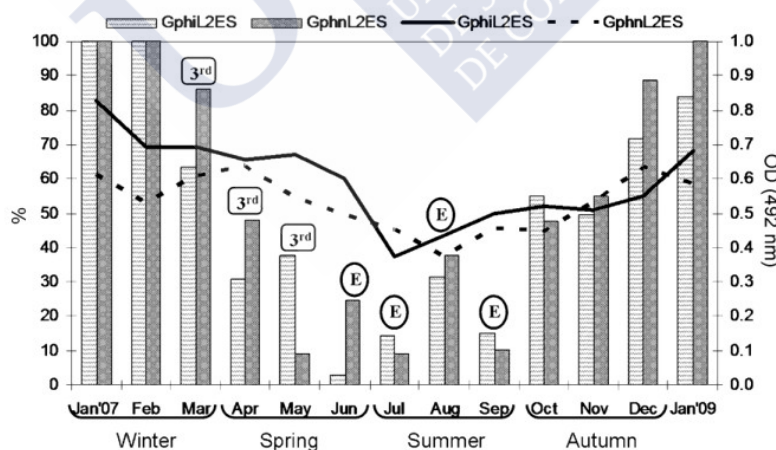


Fig. 3. Analysis of the horse antibody response against *Gasterophilus* spp. antigens. Lines represent mean values of the IgG kinetics measured on blood samples monthly collected between January 2007 and January 2008 from one group of 25 silvopasturing adult horses; bars indicate the average seasonal true seroprevalence of gasterophilosis after the analysis of blood samples collected between January 2008 and January 2009 from a total of 398 PRG silvopasturing horses in 13 different areas. (3rd): presence of 3rd stage *Gasterophilus* larvae in the faeces; (E): observation of *Gasterophilus* eggs on the horses' hair.

Table 1Analysis of the Pearson's correlation among the horse IgG humoral immune response against *Gasterophilus* spp antigens and climatic parameters.

IgG kinetics	GphnL2ES	T average	T max	T min
GphiL2ES				
Pearson correlation	0.637	−0.612	−0.481	−0.551
P	0.001	0.026	0.096	0.051
GphnL2ES				
Pearson correlation		−0.807	−0.643	−0.729
P		0.001	0.018	0.005
True Prevalence	GphnL2ES	T average	T max	T min
GphiL2ES				
Pearson correlation	0.885	−0.819	−0.804	−0.839
P	0.001	0.001	0.001	0.001
GphnL2ES				
Pearson correlation		−0.845	−0.818	−0.866
P		0.001	0.001	0.001

GphnL2ES reduced from April to August, when the lowest values were observed. The absorbances rose until the end of the study in January. Significant differences between months were observed for both GphiL2ES ($F=16.138$, $P=0.001$) and GphnL2ES ($F=22.219$, $P=0.001$). ANOVA showed significant differences between the absorbances against the two antigens ($F=19.373$, $P=0.001$); the Pearson correlation value was 0.637 ($P=0.001$) (Table 1).

Fig. 3 shows a comparable pattern of the seasonal seroprevalence of IgG antibodies against GphiL2ES and GphnL2ES. The highest values were observed in winter, and the seroprevalences then dropped to their lowest values in the late spring (*G. intestinalis*) and early summer (*G. nasalis*).

The overall seroprevalence of gasterophilosis against GphiL2ES was lower (46; 95% CI 41–51) than to the GphnL2ES (50; 95% CI 45–55) and the chi square test revealed significant differences ($\chi^2=180.682$, $P=0.001$). The agreement in the diagnostics by using the two antigens was assessed by estimating the kappa value ($\kappa=0.672$, $P=0.001$).

An analysis of cross-reactivity revealed that 89% (85–93%) of the cases positive for GphnL2ES were also positive for GphiL2ES, whereas 82% (77–87%) of the horses positive for GphiL2ES yielded positive results for GphnL2ES also.

A significant negative correlation between both the IgG kinetics against *Gasterophilus* spp. antigens and the seroprevalence of gasterophilosis, and the temperature values was found (Table 1).

4. Discussion

The usefulness of a second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses was analyzed together with data from direct observation of *Gasterophilus* eggs attached to the hair and/or 3rd stage larvae in faeces.

By using *G. intestinalis* and *G. nasalis* second-stage larvae, an overall seroprevalence around 50% was recorded, in agreement with several studies conducted on slaughtered horses from countries with the same climatic pattern (Edwards, 1982; Sweeney, 1990; Brocard and Pfister, 1991).

The finding of a seasonal dependence of seroprevalence and absorbance values led us to consider the influence of the different stages of *Gasterophilus* on the horses' humoral immune response, as recently described (Roelfstra et al., 2009).

The significant decrease in the seroprevalence and optical density values from early winter to late summer reflects a reduction in the antigenic stimulus, probably related to a larval hypometabolic status with reduced immunogenic properties associated with the third instars (Roelfstra et al., 2009) or even to the absence of larvae in the horses. The lowest values for the IgG kinetics were reached in July (*G. intestinalis*) and August (*G. nasalis*), whereas the lowest seroprevalence was observed in June (*G. intestinalis*) and in July (*G. nasalis*).

After the third instars mature, they leave the gastrointestinal tract and are voided in the faeces where the larvae burrow and pupate (Cogley and Cogley, 2000). In the current study, third instars in the faeces of the horses were observed from March to May (Fig. 4), pointing that pupation occurs during this period. It has been stated that pupation is temperature dependent, taking 22–28 days at 22–25 °C and 32 days at 18 °C (Edwards, 1982).

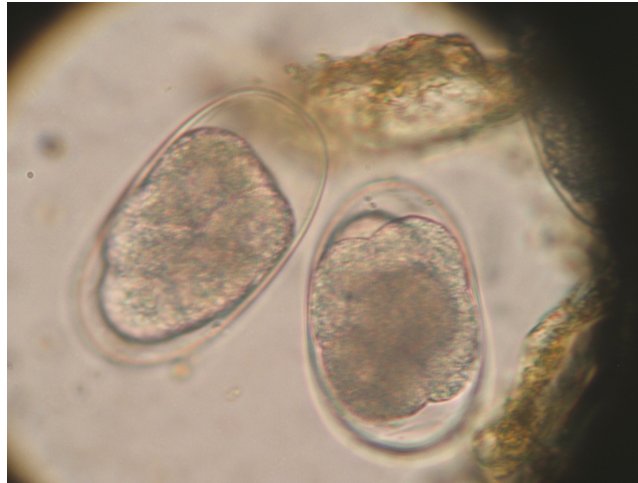
A noteworthy increase in the antibody response and in the seroprevalence from summer to winter was recorded by the ELISA based on the *Gasterophilus* excretory/secretory antigens, indicating a new antigenic stimulus in the grazing horses. Infestation of horses occurs by the ingestion of *Gasterophilus* eggs deposited by adult flies on their hairs. Eggs can only be deposited when temperatures exceed 15 °C (i.e., warm enough for the adults to fly) and is negatively influenced by rainfall (Sievers and Weber, 2005). Consequently it seems reasonable to assume that in oceanic climate pupation ends in late spring and adults fly during summer. The finding of *Gasterophilus* eggs on the horses' hair through this period supports this hypothesis, which is corroborated by the collection of third instars 8 months later (November) (Zumpt, 1965).

Once eggs are introduced into the mouth, they hatch and first instars moult into second instars after approximately 1 month (DuPont and Larish, 2003). The second larval stages move into the stomach and intestine, where they become third instars and remain immobile for the next 8–10

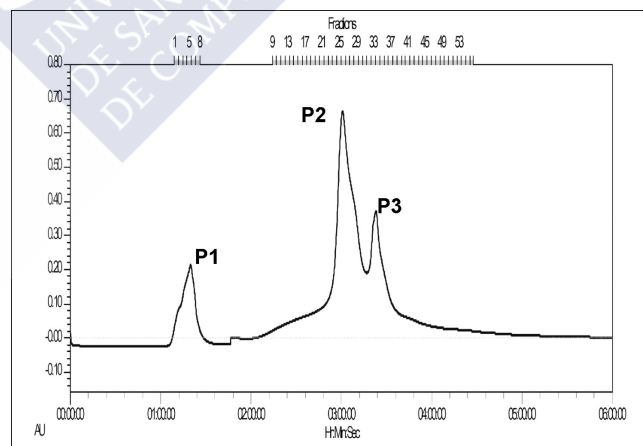
- Lyon, S., Stebbings, H.C., Coles, G.C., 2000. Prevalence of tapeworms, bots and nematodes in abattoir horses in south-west England. *Vet. Rec.* 147, 456–457.
- Otranto, D., Milillo, P., Capelli, G., Colwell, D.D., 2005. Species composition of *Gasterophilus* spp. (Diptera, Oestridae) causing equine gastric myiasis in southern Italy: parasite biodiversity and risks for extinction. *Vet. Parasitol.* 133, 111–118.
- Principato, M., 1989. Observations on the occurrence of five species of *Gasterophilus* larvae in free-ranging horses in Umbria, central Italy. *Vet. Parasitol.* 31, 173–177.
- Roelfstra, L., Deeg, C.A., Hauck, S.M., Buse, C., Membrez, M., Betschart, B., Pfister, K., 2009. Protein expression profile of *Gasterophilus intestinalis* larvae causing horse gastric myiasis and characterization of horse immune reaction. *Parasite Vectors* 2, 6.
- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76.
- Royce, L.A., Rossignol, P.A., Kubitz, M.L., Burton, F.R., 1999. Recovery of a second instar *Gasterophilus* larva in a human infant: a case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 403–404.
- Sánchez-Andrade, R., Romero, J.A., Suárez, J.L., Pedreira, J., Díaz, P., Arias, M., Paz-Silva, A., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morondo, P., Scala, A., 2005. Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Immunol. Invest.* 34, 91–99.
- Sievers, G., Weber, B., 2005. Período de oviposición de *Gasterophilus nasalis* y *G. intestinalis* en equinos: VIII Región, Chile. *Arch. Med. Vet.* 37, 169–172.
- Sweeney, H.J., 1990. The prevalence and pathogenicity of *Gasterophilus intestinalis* larvae in horses in Ireland. *Irish Vet. J.* 43, 67–73.
- Taylor, K., Hill, A., Coles, G., 2002. *Gasterophilus* in dogs. *Vet. Rec.* 150, 192.
- Thrusfield, M., 2005. *Veterinary Epidemiology*, 3rd edition. Blackwell Science, Oxford, England, 600 pp.
- Wall, R., Shearer, D., 1991. *Veterinary Ectoparasites. Biology, Pathology and Control*, 2nd edition. Blackwell Science, Oxford, pp 114–142.
- Zumt, F., 1965. *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London, UK, 111–128.







A. PAZ-SILVA, R. FRANCISCO, I. RODRÍGUEZ, I. FRANCISCO, C.F. CAZAPAL-MONTEIRO, M.S. ARIAS, J.L. SUÁREZ, R. SÁNCHEZ-ANDRADE (2011). Isolation of potentially useful antigens from cyathostomin third-stage larvae by using a fast protein liquid chromatography one-step method. **Clinical and Vaccine Immunology**, 18: 1462-1466.





CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Sept. 2011, p. 1462–1466
1556-6811/11/\$12.00 doi:10.1128/CVI.05189-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 18, No. 9

Isolation of Potentially Useful Antigens from Cyathostomin Third-Stage Larvae by Using a Fast Protein Liquid Chromatography One-Step Method[†]

A. Paz-Silva,* R. Francisco, I. Rodríguez, I. Francisco, C. F. Cazapal-Monteiro, M. S. Arias, J. L. Suárez, and R. Sánchez-Andrade

Equine Diseases Study Group (Epidemiology, Parasitology and Zoonoses), Animal Pathology Department, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, 27002-Lugo, Spain

Received 23 May 2011/Returned for modification 13 June 2011/Accepted 7 July 2011

Three major protein complexes (51, 29, and 15 kDa, named P1 to P3, respectively) were resolved by gel filtration of the excretory/secretory antigens collected from a mixture of horse cyathostomin third-stage larvae (L3s). The potential application for the detection of infected horses was assessed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by the comparison of the serological and copromicroscopical results. The value of the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve was higher than 0.9 when the three peaks were used. Elevated values (>90%) for the sensitivity, specificity, and the positive-likelihood ratio were also observed for all the antigen complexes. A significant increment in the IgG antibody levels 4 weeks prior to the observation of eggs in the feces of weanlings naturally infected was recorded. Our results indicate that the evaluation of chemotherapy is possible by using immunoenzymatic probes and fast protein liquid chromatography (FPLC)-purified antigens. Data collected in the present investigation indicate that FPLC isolation offers a very helpful one-step method for collecting antigens with diagnostic potential to be employed in immunoenzymatic probes.

The horse is host to a great number of helminths, of which nematodes of the family Strongylidae, the roundworm *Parascaris equorum* and the cestode *Anoplocephala perfoliata*, are the most important (11). Several investigations demonstrated the high prevalence of strongyles, which are ubiquitous parasites responsible for clinical disease in horses (13, 19). With the decline of infections caused by large strongyles as a result of widespread use of modern anthelmintic compounds, the clinical importance of the small strongyles has been underscored, and these nematodes have been recognized as an important cause of digestive diseases in horses, including weight loss, hypoalbuminemia, and diarrhea as well as colic, poor growth, anemia, and rough hair coat (17).

Cyathostominae are a subfamily of the strongylid roundworms of horse with a continuous life cycle, and infection occurs when horses consume grass contaminated by infective larval stages (L3), which can undergo a period of inhibited development as early third-stage larvae (L3) in the wall of large intestine (12, 18). These inhibited larvae can constitute up to 90% of the total cyathostomin burden and become very significant in cyathostomin-associated disease because large numbers of larvae can accumulate and reactivate to provoke a syndrome known as larval cyathostominosis (25).

Routinely, detection of infection by cyathostomins is based on fecal egg count analysis, which indicates the presence of adult organisms in the host. Only a few methods using sero-

logical probes for the detection of infection by cyathostomins have been developed, based on the use of somatic complexes obtained after the sonication of L3 and L4 cyathostomin larval stages, electrophoresis in SDS-PAGE gels, and posterior elution (1, 3). In this way, several antigens with diagnostic potential for estimating mucosal larval burdens were found, which could be helpful for the control of this parasitosis (2). More recently, the characterization of an immunodiagnostic marker for cyathostomin developing-stage larvae has been reported (14).

The composition of excretory/secretory antigens is less complex than that of somatic products, so these products have been used for the diagnosis of several parasitic diseases (8, 22, 24, 26). The study presented here analyzes the potential use of protein fractions collected after the incubation of a mixture of cyathostomin third-stage larvae and then run under an automated system of gel exclusion chromatography.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. Two experiments were developed in the current work using indigenous Pura Raza Galega (PRG) horses. The first consisted of assessing the suitability of the antigens collected from cyathostomin third-stage larvae for the detection of cyathostomin infection by using horse serum samples. On May 2009, one sample of blood and feces was individually collected from 46 4-month weanlings (G-W) and 53 1-month suckling foals (G-S). These animals were sold 2 weeks after the sampling.

Prior to the sampling, the weanlings were allowed to graze from the time of their foaling to allow the natural infection by cyathostomins, and their sera were employed as positive controls. In contrast, the suckling foals remained stabled without access to herbage to prevent the possibility of parasite infection. The sera from these animals were used as negative controls in the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).

In the second experiment, the kinetics of the humoral antibody response against fast protein liquid chromatography (FPLC)-isolated antigens from L3 in

* Corresponding author. Mailing address: Equine Diseases Study Group, Animal Pathology Department, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, 27002-Lugo, Spain. Phone: 34 982 822 126. Fax: 34 982 252 195. E-mail: adolfo.paz@usc.es.

[†] Published ahead of print on 20 July 2011.

TABLE 1. Gel filtration chromatography protocol

Step	Vol (ml)	Description
1	0.00	Collection of 4-ml fractions during entire run
2	0.00	Lamp (UV detector) turned on
3	0.00	Zero baseline
4	0.00	Isocratic flow
5	5.00	Load/inject 2.5-ml sample
6	7.5	Isocratic flow
7	600	End of protocol

naturally infected horses was assessed. Between June and October 2009, blood and fecal samples were taken from one herd of 16 3-month weanlings. These equines fed on pastures from the date of their foaling to ensure the infection. All the animals were bled by jugular venous puncture, and the sera were kept at -35°C until used (7).

Copromicroscopical analysis. Five grams of each fecal sample was processed (in duplicate) by the quantitative McMaster flotation technique (16), with a specific gravity of 1.2 and a sensitivity of 10 eggs per gram (EPG). The laboratory technician conducting the microscope analysis was blinded to the study design and the selection of the stool specimens.

The genus identification of strongyle eggs was done by culturing fecal samples for 10 to 14 days at 20 to 25°C to allow the development of L3, which were collected by means of the Baermann procedure and then identified according to previously described methods (6, 10).

Analysis of the IgG humoral response. By taking into account previous investigations about the usefulness of metabolic (excretory/secretory) antigens for the detection of different parasite infections by means of immunoenzymatic probes (22, 23), we prepared excretory/secretory antigens from cyathostomin third-stage larvae (L3CES).

Antigen preparation. To obtain a large quantity of L3 cyathostomins, feces from horses passing strongyle eggs were collected and cultured according to previous investigations (5). All these larval cultures were examined under the microscope as stated previously, and only cyathostomins were detected. Once larvae reached the third stage (9), they were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 in RPMI medium, using a ratio of approximately 1,000 larvae/1.5 ml of RPMI medium. During a 3-day period, the medium was removed every 6 h and then centrifuged, dialyzed extensively against water, and concentrated.

Gel filtration chromatography. The native L3CES were fractionated under nonreducing conditions by size exclusion fast protein liquid chromatography (FPLC) on a Duo-Flow (Bio-Rad, Madrid, Spain) system with a Sepharose S-200 HR 10/30 column (Pharmacia, Madrid, Spain) (15). The applied protocol is reflected in Table 1.

Fractionation of the L3CES was performed by the injection of 2.5 ml of antigen at a protein concentration of 5 mg ml^{-1} . The buffer (pH 7.4) was composed of bisodium phosphate (50 mM), monosodium phosphate (50 mM), and sodium chloride (15 mM). All the antigens and the buffers were passed through a 0.22- μm -pore-size filter before the introduction into the FPLC system.

One pool of several standards (67, 43, 25, and 13.7 kDa) (Pharmacia) was also run to allow the estimation of the molecular mass of the purified proteins.

The heat stability for each antigen was assessed by incubation at 65°C, and no differences were reached in respect to nonheated proteins.

ELISA. ELISAs were performed on serum samples by using U-bottom microtiter plates (Costar, Barcelona, Spain). The antigen concentration, the sera, and immunoconjugate dilutions were assessed by a checkerboard titration. The plates were coated with 100 μl per well of L3CES at a concentration of 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in a phosphate-buffered saline (PBS) coating buffer (pH 7.4) for 10 to 12 h at 4°C. Serum was added at 1:200. A dilution of horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-equine IgG(T) (Sigma, Madrid, Spain) was added at 1:1,000 and incubated at 37°C for 1 h. Five minutes after a substrate composed of OPD (*ortho*-phenylenediamine; Sigma), citrate buffer (pH 4), and H_2O_2 was added, the absorbances were read using a Titertek Multiskan spectrophotometer at 492 nm.

A pool of sera from the grazing weanlings (G-W) was used as a positive control in each plate, and another from suckling foals (G-S) was used as a negative control.

Statistical analysis. Statistical analysis was first performed using Levene's test of homogeneity, and then analysis of variance (ANOVA) was performed for the analysis of the egg output and the absorbances. Differences were considered significant at a P value of <0.05 .

The copromicroscopical flotation technique was utilized as the gold standard. The percentages of the predictive values and the likelihood ratios were estimated according to Thrusfield (27), by considering the respective sensitivities and specificities obtained with the receiver operating characteristic (ROC) curves for each cutoff value.

The existence of correlations among the different parameters was assessed by using the Pearson test. The kappa statistic was used to quantify agreement between the flotation test and the ELISA.

All tests were done using SPSS for Windows (version 15.0).

Cutoff estimation. A ROC analysis, or ROC curve, was performed to determine a cutoff value for each isolated antigen by using the sera from naturally infected and uninfected foals (experiment 1) (see Fig. 2). Levels of sensitivity were plotted against 1 minus specificity at each cutoff point on a ROC curve. Threshold values used were those that gave the highest values of sensitivity (S), specificity (SP), positive-likelihood ratio (PLR), and the area under the curve (AUC), while lower values for the negative-likelihood ratio (NLR) were expected (27).

ROC analysis is a useful tool for evaluating the performance of diagnostic tests and more generally for evaluating the accuracy of a statistical model (e.g., logistic regression or linear discriminant analysis) that classifies subjects into one of two categories, diseased or nondiseased. Its function as a simple graphical tool for displaying the accuracy of a medical diagnostic test is one of the most well-known applications of ROC curve analysis (28).

Analysis of the cross-immunity. To determine the possible development of cross-immunity, sera from the horses in experiment 1 were challenged with excretory/secretory antigens of second-stage *Parascaris equorum* larvae.

RESULTS

Copromicroscopical findings. Only eggs belonging to intestinal Nematoda were observed in the feces, whereas no coccidian oocysts or eggs from Trematoda, Cestoda, or lungworm larvae were obtained. By using the flotation copromicroscopical technique, strongyle eggs were recorded in the feces of G-W only, and the examinations of the feces of G-S were negative.

The coprocultures showed the presence of larvae belonging to *Cyathostomum* and *Poteriostomum* (6, 10).

Experiment 1: analysis of the FPLC-isolated antigens. Three major protein complexes were resolved by gel filtration of the L3CES (Fig. 1). The fractions corresponding to each complex were collected separately (peak 1 [P1] to P3), and their molecular masses were estimated at 51, 29, and 15 kDa, respectively.

Table 2 summarizes some data obtained from the antigen

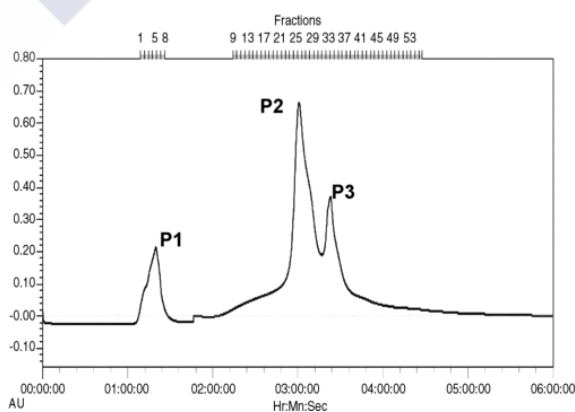


FIG. 1. Chromatogram of the FPLC protein complexes isolated from a mixture of cyathostomin third-stage larvae. AU, arbitrary units.

TABLE 2. Analysis of the liquid chromatography (FPLC) protein complexes isolated from a mixture of cyathostomin third-stage larvae^a

Antigen peak and size (kDa)	Cutoff value	AUC	P	S (%)	SP (%)	PLR	NLR
P1 (51)	0.4850	0.982	0.001	92	98	46	0.08
P2 (29)	0.4965	0.985	0.001	92	94	15	0.08
P3 (15)	0.4815	0.982	0.001	92	91	10	0.09

^a The cutoff point for each antigen was established on the basis of the highest values achieved for the AUC (maximum 1), S (sensitivity, 0 to 100), SP (specificity, 0 to 100), PLR (positive-likelihood ratio; elevated numbers are expected), and NLR (negative-likelihood ratio; low values are expected).

analysis by establishing a comparison between the ELISA probe and the copromicroscopical one.

The estimation of cutoff values of 0.485, 0.4965, and 0.481 for the P1, P2, and P3 antigens, respectively, yielded a high diagnostic value (area under the ROC curve, AUC, of >0.9 ; $P < 0.05$) for the P1, P2, and P3 peaks.

Elevated values ($>90\%$) for the sensitivity, specificity, and the positive-likelihood ratio were obtained for all the antigen complexes used (Fig. 2).

The concordance in the diagnostics of cyathostomin infection by using the ELISA and the copromicroscopy was established by the estimation of the kappa statistic, and a value of 0.7 ($P = 0.001$) was achieved for P1, P2, and P3.

Analysis of cross-immunity. Sera from 6 out of 46 weanlings (13%) did react to the *P. equorum* L2 excretory/secretory antigens, as did sera from 5 out of 53 suckling foals (9%).

Experiment 2: IgG kinetics against FPLC-purified antigens. As shown in Fig. 3, strongyle eggs were observed at the 12th week of the study. The IgG(T) antibodies against P1 and P2 exhibited similar patterns (Fig. 4), increasing significantly from the 8th week, when values above the cutoff point were recorded. The antibody kinetics increased again at the 12th week

(P2) and 14th week (P1). Higher absorbances against P1 were achieved.

Figure 4 shows that antibody values exceeding the cutoff point against P3 were obtained from the 16th week.

Positive correlation between the egg counts and the antibody values against the P1 ($\rho = 0.708$, $P = 0.001$), P2 ($\rho = 0.720$, $P = 0.001$), and P3 ($\rho = 0.517$, $P = 0.001$) were recorded.

DISCUSSION

Grazing equines ingest cyathostomin infective third-stage larvae (L3) with the grass, and after exsheathing in the small intestine, the larvae penetrate the mucosa or the submucosa and molt to fourth-stage larvae (L4) in the intestinal wall within a fibroblastic cyst (4).

Knowledge of the host-parasite relationships is essential to the consideration of efficient strategies for their control based on the appropriate diagnosis. By using an FPLC one-step method, three protein complexes (51, 29, and 15 kDa) were identified in the excretory/secretory antigens collected from a mixture of cyathostomin third-stage larvae. After their use in a serological probe (ELISA), all were recognized by IgG(T) in serum from naturally infected foals. The presence of two antigen complexes of 25 and 20 kDa which were bound by IgG(T)

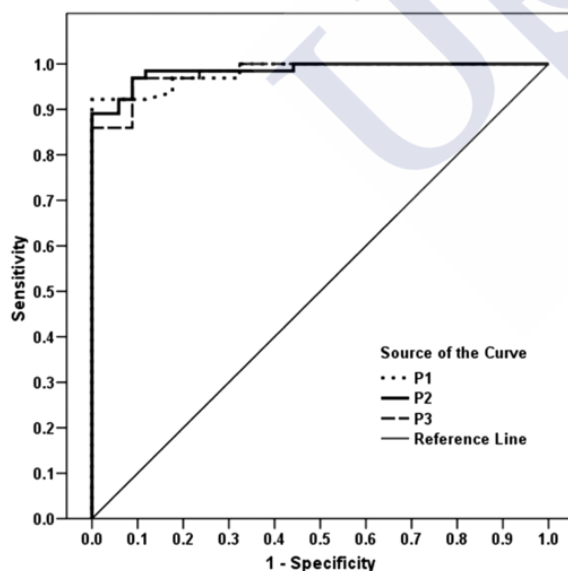


FIG. 2. ROC analysis of the results achieved by using the FPLC protein complexes isolated from a mixture of cyathostomin third-stage larvae and sera from infected and uninfected horses.

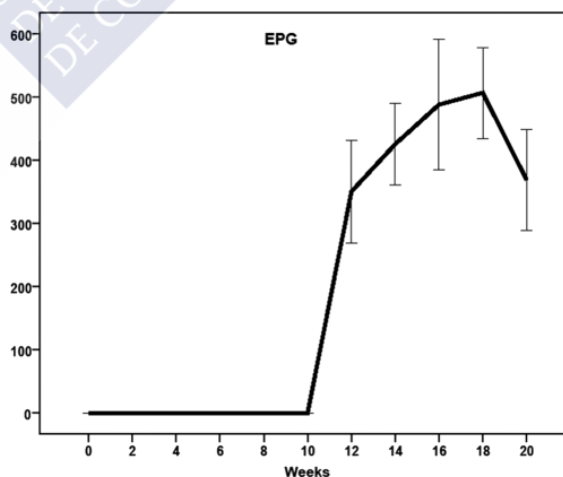


FIG. 3. Kinetics of cyathostomin egg output in naturally infected weanlings. Values along the y axis represent numbers of cyathostomin eggs per gram of feces (EPG). Data represent the mean values plus 2 standard deviations.

relies in the possibility of automating this procedure, improving the collection of purified antigens.

Equine cyathostomin infections are the main targets of parasite control programs based mostly on the administration of anthelmintics (20). By means of the copromicroscopical flotation test, the period of the appearance of eggs in feces has been established as more than 12 weeks after infection; thus, the convenience of probes providing an earlier diagnostic seems essential.

The ELISA is very valuable for the detection of many parasitic infections and provides the possibility for the simultaneous processing of many samples, reducing the cost for the analyses; however, appropriate antigens are required. In the current research, three protein complexes have been purified by means of liquid chromatography (FPLC). The early detection of infected horses has been achieved by using two antigens of 29 and 15 kDa and the immunoenzymatic procedure.

Data collected in the present investigation indicate that FPLC purification offers a very helpful one-step method for collecting antigens with a diagnostic potential to be employed in immunoenzymatic probes. Further studies are in progress to get more information on the composition of these antigens and on the host-parasite relationships to improve their usefulness.

ACKNOWLEDGMENTS

We are in debt to B. Valcárcel for her valuable assistance in the preparation of the manuscript.

This work was partly sponsored by the Research Project XUGA 10MDS261023PR (Xunta de Galicia, Spain). This sponsor was not involved in the experimental design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to submit the manuscript for publication.

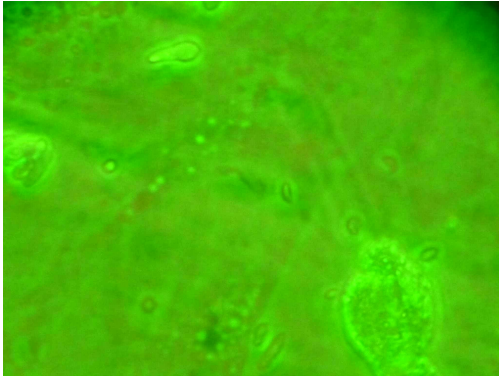
None of the authors has established any financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) the current work.

This project underwent ethical review and was given approval by the Ethics Committee of the University of Santiago de Compostela, Spain, and the care and use of the horses complied with Spanish animal welfare laws, guidelines, and policies.

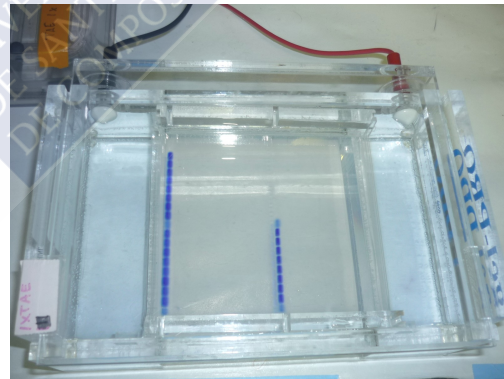
REFERENCES

- Dowdall, S. M. J., et al. 2002. Antigen-specific IgG(T) responses in natural and experimental cyathostominae infection in horses. *Vet. Parasitol.* **106**: 225–242.
- Dowdall, S. M. J., C. J. Proudman, T. R. Klei, T. Mair, and J. B. Matthews. 2004. Characterisation of IgG (T) serum antibody responses to two larval antigen complexes in horses naturally—or experimentally—infected with cyathostomins. *Int. J. Parasitol.* **34**:101–108.
- Dowdall, S. M. J., C. J. Proudman, S. Love, T. R. Klei, and J. B. Matthews. 2003. Purification and analyses of the specificity of two putative diagnostic antigens for larval cyathostomin infection in horse. *Res. Vet. Sci.* **75**:223–229.
- Eysker, M., J. Jansen, and M. H. Mirck. 1984. Inhibited development of cyathostominae in the horse in the early third stage. *Res. Vet. Sci.* **37**:355–356.
- Francisco, I., et al. 2009. Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: analysis of the infection by endoparasites. *Vet. Parasitol.* **164**:357–362.
- Francisco, I., et al. 8 April 2009. Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under an oceanic climate area (NW Spain). *J. Parasitol. Res.* doi:10.1155/2009/616173.
- Francisco Vázquez, I. 2005. Epidemiology and control of the main parasitism affecting horses in NW Spain. Ph.D. thesis. Veterinary Faculty of the Santiago de Compostela University, Lugo, Spain.
- Kjaer, L. N., M. M. Lungholt, M. K. Nielsen, S. N. Olsen, and C. Maddox-Hyttel. 2007. Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. *Equine Vet. J.* **39**:529–533.
- Lichtenfels, J. R., V. A. Kharchenko, and G. M. Dvojnos. 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet. Parasitol.* **156**:4–161.
- Lichtenfels, J. R., V. A. Kharchenko, R. C. Krecsek, and L. M. Gibbons. 1998. An annotated checklist by genus and species of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostominae) of horses, asses and zebras of the world. *Vet. Parasitol.* **79**:65–79.
- Lind, E. O., et al. 2007. Parasite control practices on Swedish horse farms. *Acta Vet. Scand.* **49**:25.
- Love, S., D. Murphy, and D. Mellor. 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Vet. Parasitol.* **85**:113–122.
- Mair, T., T. Divers, and N. Ducharme. 2002. Manual of equine gastroenterology, 1st ed. W. B. Saunders, London, United Kingdom.
- McWilliam, H. E., A. J. Nisbet, S. M. Dowdall, J. E. Hodgkinson, and J. B. Matthews. 2010. Identification and characterisation of an immunodiagnostic marker for cyathostomin developing stage larvae. *Int. J. Parasitol.* **40**:265–275.
- Mezo, M., M. González-Warleta, and F. M. Ubeira. 2003. Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. *J. Parasitol.* **89**:843–849.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Great Britain. 1986. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. Her Majesty's Stationary Office, London, United Kingdom.
- Murphy, D., and S. Love. 1997. The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. *Vet. Parasitol.* **70**:99–110.
- Osterman, L. E. 2005. Prevalence and control of Strongyle nematode infections of horses in Sweden. Ph.D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Osterman, L. E., M. Eysker, O. Nilsson, A. Ugglä, and J. Höglund. 2003. Expulsion of small strongyle nematodes (cyathostomin spp) following deworming of horses on a stud farm in Sweden. *Vet. Parasitol.* **115**:289–299.
- Ramsey, Y. H., et al. 2004. Seasonal development of Cyathostominae larvae on pasture in a northern temperate region of the United Kingdom. *Vet. Parasitol.* **119**:307–318.
- Reinemeyer, C. R., and M. K. Nielsen. 2009. Parasitism and colic. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **25**:233–245.
- Romasanta, A., et al. 2003. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays—analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol. Invest.* **32**:131–142.
- Sánchez-Andrade, R., et al. 2005. Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Immunol. Invest.* **34**:91–99.
- Sánchez-Andrade, R., et al. 2010. A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. *Vet. Parasitol.* **171**:314–320.
- Smets, K., D. Shaw, J. Deprez, and J. Vercruysse. 1999. Diagnosis of larval cyathostomiasis in horses in Belgium. *Vet. Rec.* **144**:665–668.
- Suárez, J. L., et al. 2005. Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Vet. Parasitol.* **134**:153–158.
- Thrusfield, M. 2005. Veterinary epidemiology, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, England.
- Zou, K. H., A. J. O'Malley, and L. Mauri. 2007. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation* **115**:654–657.





M. ARIAS, M. YEARGAN, I. FRANCISCO, S. DANGOUDOUBIYAM, P. BECERRA, R. FRANCISCO, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, A. PAZ-SILVA, D.K. HOWE. (2010). Exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigen. **Veterinary Parasitology**, 185: 301-304.







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigenM. Arias^a, M. Yeargan^b, I. Francisco^a, S. Dangoudoubiyam^b, P. Becerra^a, R. Francisco^a, R. Sánchez-Andrade^a, A. Paz-Silva^{a,*}, D.K. Howe^b^a Equine Diseases Study Group (Epidemiology, Parasitology and Zoonoses), Animal Pathology Department, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, 27002 Lugo, Spain^b Department of Veterinary Science, University of Kentucky, 108 Gluck Equine Research Center, Lexington, KY 40546-0099, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2011

Received in revised form

21 September 2011

Accepted 30 September 2011

Keywords:

Sarcocystis

Horse

Spain

Seroprevalence

Immunoassays

Antibodies

ABSTRACT

Horses serve as an intermediate host for several species of *Sarcocystis*, all of which utilize canids as the definitive host. *Sarcocystis* spp. infection and formation of latent sarcocysts in horses often appears to be subclinical, but morbidity can occur, especially when the parasite burden is large. A serological survey was conducted to determine the presence of antibodies against *Sarcocystis* spp. in seemingly healthy horses from the Galicia region of Spain. Western blot analyses using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigen suggested greater than 80% seroprevalence of *Sarcocystis* spp. in a sample set of 138 horses. The serum samples were further tested with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on recombinant *S. neurona*-specific surface antigens (rSnSAGs). As expected for horses from the Eastern Hemisphere, less than 4% of the serum samples were positive when analyzed with either the rSnSAG2 or the rSnSAG4/3 ELISAs. An additional 246 horses were tested using the rSnSAG2 ELISA, which revealed that less than 3% of the 384 samples were seropositive. Collectively, the results of this serologic study suggested that a large proportion of horses from this region of Spain are exposed to *Sarcocystis* spp. Furthermore, the anti-*Sarcocystis* seroreactivity in these European horses could be clearly distinguished from anti-*S. neurona* antibodies using the rSnSAG2 and rSnSAG4/3 ELISAs.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sarcocystis spp. are coccidian parasites that can infect a very wide range of animals. Two hosts are needed to complete the life cycle; a carnivorous definitive host supports sexual reproduction that produces oocysts and sporocysts, while infection of the intermediate host results in asexual development that produces sarcocysts in muscle tissues. Sarcocystosis in equids is known to occur worldwide,

but there remains some uncertainty about the species of *Sarcocystis* that may be responsible for infection and sarcocyst formation in horses (reviewed in Dubey et al., 1989). Although four species of *Sarcocystis*, *S. bertrami*, *S. equicani*, *S. fayeri*, and *S. asinus*, have been described to produce sarcocysts in equine muscle, it is questionable whether all of these species are valid (Dubey et al., 1989). It is well established that *Sarcocystis neurona* can infect and cause the neurologic disease equine protozoal myeloencephalitis (EPM) in horses (Dubey et al., 1991), but *S. neurona* is found only in the Western Hemisphere since the opossum definitive hosts are restricted to North, Central, and South America. Furthermore, sarcocysts of *S. neurona* have been

* Corresponding author. Tel.: +34 982285900; fax: +34 982252195.
E-mail address: adolfo.paz@usc.es (A. Paz-Silva).

found in only a single horse (Mullaney et al., 2005), so it is not apparent that equids commonly serve as intermediate hosts for this parasite.

Horses infected with the sarcocyst-forming species of *Sarcocystis* may exhibit no clinical signs, although fever, anorexia, lethargy, and muscle soreness can occur, particularly when there is a high parasite burden (Fayer et al., 1983; Cawthorn et al., 1990). A limited number of surveys have been conducted to determine the prevalence of sarcocysts in equids from assorted geographic locations (Erber and Geisel, 1981; Edwards, 1984; Gunn and Fraher, 1992; Woldemeskel and Gebreab, 1996; Fukuyo et al., 2002), with widely varying results that ranged from 4% in Great Britain and Ireland to 93% in Mongolia. Animal care and density of the canine definitive hosts will certainly contribute to differences in exposure of horses to *Sarcocystis* spp., but highly discrepant prevalence rates have been observed in horse populations that are seemingly very similar (Edwards, 1984; Gunn and Fraher, 1992). Gross examination of muscle tissues at slaughter or necropsy is the standard method for identifying latent *Sarcocystis* spp. in horses throughout the world, which may have contributed to the differing results that have been described.

Western blot has been used routinely to detect *S. neurona* infection in New World horses. However, these analyses reveal obvious antigenic cross-reactivity with other species of *Sarcocystis*, such as *S. fayeri* (Hoane et al., 2005), so specificity for *S. neurona* has depended on careful interpretation of immunoreactive bands and/or modification of assay conditions (Granstrom et al., 1993; Rossano et al., 2000; Saville et al., 2004). In the present study, we have capitalized on the antigenic cross-reactivity in *S. neurona* Western blots to demonstrate that there is extensive exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain. Further analyses with an *S. neurona*-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) confirmed that the horses had not been infected with *S. neurona*, as expected since this parasite is restricted to the Western Hemisphere.

2. Materials and methods

The current survey was conducted on 384 horses from the Galicia region of NW Spain (Table 1). For the study, a questionnaire was sent to 79 horse owners; full compliance was obtained. All of the study horses were from Europe and none had traveled to the Western Hemisphere.

Blood samples were collected by equine veterinary clinicians attending the horses and sent to the lab under refrigeration. The sera were separated and stored in aliquots at -20°C . Three immunoassays were conducted for the current study. A total of 138 serum samples were initially tested for the presence of anti-*Sarcocystis* antibodies by Western blot analysis of whole-merozoite antigen of the SN3 strain of *S. neurona*. These samples were subsequently tested using the *S. neurona*-specific rSnSAG2 and rSnSAG4/3 ELISAs (Hoane et al., 2005; Yeagan and Howe, 2011). The remaining 246 horse serum samples were tested using the rSnSAG2 ELISA.

Parasite propagation in cell culture, Western blots, and ELISAs were performed as described previously (Hoane et al., 2005; Yeagan and Howe, 2011). The positive and

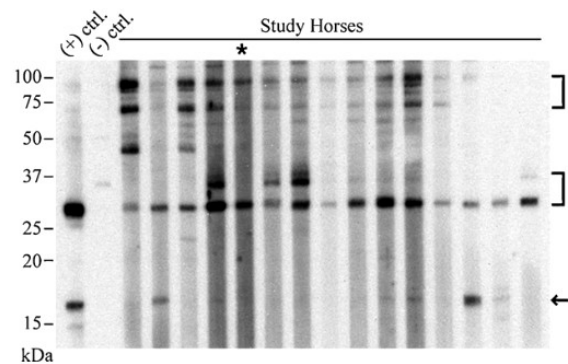


Fig. 1. Western blot of *Sarcocystis neurona* whole-merozoite antigen to detect antibodies against *Sarcocystis* spp. in sera collected from horses in the Galicia region of Spain. The positive and negative control sera were from a horse diagnosed with EPM caused by *S. neurona* and from a seronegative foal, respectively. Seropositive samples from the Spain study horses typically reacted with molecules in the range of 30–35 kDa and 70–90 kDa (indicated with brackets). A lower proportion of these horses had antibodies that reacted with a molecule(s) that migrated at approximately 16–17 kDa (arrow). One sample (indicated by *) tested positive in both ELISAs.

negative control sera used for both the Western blot assay and the ELISAs were from an EPM horse and from a seronegative foal, respectively. To account for inter-plate variations, the optical densities for the control sera were used to calculate a percent positivity (PP) value for each serum sample (Wright et al., 1993), as described (Hoane et al., 2005). Although a liberal PP cut-off of 10% is currently used for clinical testing of samples from horses in the Western Hemisphere, the original more conservative PP cutoff of 20% (Hoane et al., 2005) was used to identify seropositive samples.

3. Results

A significant number of serum samples (114 of 138, 82.6%) reacted with molecules at approximately 30–35 kDa, with most of these sera also recognizing two prominent molecules in the range of 70–90 kDa (Fig. 1). Of these seropositive samples, 26.1% (36/138) showed weak to moderate immunoreactivity at approximately 16–17 kDa. These Western blot results suggested that a large proportion of the equine test population had been infected with a species of *Sarcocystis*.

Two of the immunoreactive bands recognized by horses from Spain co-migrate with the immunodominant molecules at approximately 30 kDa and 16 kDa that are commonly detected by serum from horses infected with *S. neurona* and diagnosed with EPM (see Fig. 1). To confirm that these animals did not have antibodies against *S. neurona*, as would be expected for horses in the Eastern Hemisphere, samples were tested using the *S. neurona*-specific rSnSAG2 and rSnSAG4/3 ELISAs. Of the 138 horses that were initially tested by Western blot, only five (3.62%) were seropositive by rSnSAG2 ELISA at a conservative PP cut-off value of 20%, while four of 134 horses (3%) were seropositive by the rSnSAG4/3 ELISA at a 20% cut-off (Table 2; there was insufficient serum to test four samples

Table 1
Distribution of sampled horses from Spain according to their breed, gender and age.

Breed	Gender	Age (year)			Total
		<3	3–10	>10	
Arabian Pure Breed	Female	3	4	4	18
	Male	2	2	3	
Crossbred	Female	13	18	12	64
	Male	5	7	9	
English Pure Breed	Female	7	8	10	35
	Male	6	3	1	
Pura Raza Galega (indigenous)	Female	31	92	37	192
	Male	11	16	5	
Spanish Pure Breed	Female	4	3	0	21
	Male	5	6	3	
Spanish Sport Horse	Female	6	13	12	51
	Male	4	10	6	
American Trotter	Female	0	1	2	3
Total					384

with the rSnSAG4/3 assay). A seropositive result by both ELISAs was observed for only two horses, and only one of these horses exhibited significant reactivity (i.e., PP > 50%) in both assays.

Along with the serum samples tested with all three assays (i.e., Western blot and both ELISAs), an additional 246 horses were examined with the rSnSAG2 ELISA. In the complete sample set of 384 equine sera, a positive result to the rSnSAG2 antigen was observed in only 2.34% (9 of 384) of the samples when a cut-off value of 20% was used (Table 1). Even if a liberal PP cut-off of 10% was used, only 9.3% (37 of 384) of the serum samples were considered seropositive. Collectively, the results confirmed that reactivity to the immunodominant bands in Western blots was not due to antibodies specific for *S. neurona*.

4. Discussion

The horse is a natural intermediate host for several species of *Sarcocystis* species that complete their life cycles in canine definitive hosts (Dubey et al., 1989). Prior surveys for latent *Sarcocystis* in equids from Europe have relied on

examination of muscle tissues at slaughter or necropsy to identify the presence of sarcocysts, which likely gave an underestimate of the true prevalence (Erber and Geisel, 1981; Edwards, 1984; Gunn and Fraher, 1992). In the present study, we have utilized Western blot analysis of *S. neurona* whole-merozoite antigen to assess exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from the region of Galicia in Spain. These analyses suggested that a large proportion of the equine population in this region (>80%) have been infected by *Sarcocystis* spp. and may harbor sarcocysts. It cannot be completely disregarded that the immunoblot reactivity was due to infection with another coccidian parasite (e.g., *Toxoplasma gondii* or *Besnoitia* spp.). However, prior comparisons of antigenic cross-reactivity between closely related coccidian parasites, such as *T. gondii* and *Neospora caninum*, have shown that heterologous sera exhibit modest reactivity in Western blots, but the pattern of molecules recognized tends to be random and not specific for immunodominant antigens (for example, Howe and Sibley, 1997). Therefore, it seems probable that the observed seroreactivity with the ~30 kDa and 16 kDa molecules was due to exposure to a species of *Sarcocystis* and not another genus of Coccidia. As anticipated, the rSnSAG2 and rSnSAG4/3 ELISA results confirmed that the immunoreactivity observed in Western blots is not specific for *S. neurona*, but instead represents cross-reactivity to unknown epitopes shared among different *Sarcocystis* species. These data further support previous work showing that the rSnSAG2 and rSnSAG4/3 ELISAs are highly specific for detecting *S. neurona*-specific antibodies (Hoane et al., 2005; Yeargan and Howe, 2011).

Opossums (*Didelphis* spp.), which are restricted geographically to the New World, serve as the definitive host for *S. neurona* (Fenger et al., 1995; Dubey et al., 2001). Therefore, infection of horses by *S. neurona* is limited ostensibly to the North American and South American continents. However, antibody reactivity against *S. neurona* has been reported in both healthy and neurologic horses from France (Pitel et al., 2002, 2003). The serologic

Table 2
ELISA percent positivity (PP) values and Western blot results for horses from Spain that tested seropositive by rSnSAG2 or rSnSAG4/3 ELISA.

Horse #	PP value		Western blot	
	rSnSAG2	rSnSAG4/3	16–17 kDa	30–35 kDa
394	108.2	160.5	+	+
173/5	52.9	29.5	+	+
472	35.6	6.0	+	+
301	33.8	6.5	–	+
625	33.7	9.4	–	+
593	7.9	22.1	–	+
90	3.6	25.3	–	+
542	73.8	ND	ND	ND
258	33.6	ND	ND	ND
235	30.4	ND	ND	ND
564	25.3	ND	ND	ND

ND, not determined.

assays used for these prior studies were not validated for analysis of Old World horses, so it is possible that some of the positive results were false, particularly for the healthy horses that were sampled (Pitel et al., 2003). It is interesting to note, however, that one of the horses from Spain tested in the present study exhibited very high antibody titers for both the SnSAG2 and SnSAG4/3 ELISAs (PP > 100%). This horse was a 7-year old mare that originated from Ireland and had no apparent cause for exposure to *S. neurona*. As speculated previously (Pitel et al., 2002, 2003), it is possible that these European horses were exposed to *S. neurona* via contaminated food from the Americas. It seems highly unlikely that a non-opossum definitive host for *S. neurona* exists in Europe, but a closely related *Sarcocystis* species that occupies a different life cycle cannot be ruled out.

With *S. neurona* infection being the exception, infection and formation of latent sarcocysts in horses by *Sarcocystis* spp. is often benign. However, clinical signs can occur in an infected horse, especially when there is a high parasite burden (Fayer et al., 1983; Cawthorn et al., 1990). As well, it is conceivable that more subtle effects, such as decreased performance, may be associated with sub-clinical, latent infections by *Sarcocystis* spp., which is apparently common in horses. Therefore, efforts to reduce the risk of exposing horses to *Sarcocystis* spp., by eliminating access of canids to deceased horses for example, may be warranted in regions where the parasite is highly prevalent.

Conflict of interest

All authors declare the absence of any financial or personal interests that could inappropriately influence the current work. The final article has been approved by all authors. The ELISAs used in this study were developed at the University of Kentucky and have been licensed for commercial use.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Projects XUGA PGIDT06RAG26102PR and 07MDS021261PR (Xunta de Galicia, Spain) and by funds from the Amerman Family Equine Research Endowment (D.K.H.), and complies with the current laws for Animal Health Research in Spain.

Dr. Arias, Dr. Francisco and Dr. Paz-Silva were visiting research scientists at the M.H. Gluck Equine Research Center, University of Kentucky Department of Veterinary Science under the supervision of Dr. D.K. Howe, with the financial support of the Xunta de Galicia (XUGA, Spain). We are in debt to Mrs. B. Valcárcel for preparing and editing the manuscript.

References

- Cawthorn, R.J., Clark, M., Hudson, R., Friesen, D., 1990. Histological and ultrastructural appearance of severe *Sarcocystis fayeri* infection in a malnourished horse. J. Vet. Diagn. Invest. 2, 342–345.
- Dubey, J.P., Davis, S.W., Speer, C.A., Bowman, D.D., de Lahunta, A., Granstrom, D.E., Topper, M.J., Hamir, A.N., Cummings, J.F., Suter, M.M., 1991. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. J. Parasitol. 77, 212–218.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Kerber, C.E., Kasai, N., Pena, H.F., Gennari, S.M., Kwok, O.C., Shen, S.K., Rosenthal, B.M., 2001. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. Vet. Parasitol. 95, 295–304.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R., 1989. *Sarcocystosis of Animals and Man*. CRC Press, Inc.
- Edwards, G.T., 1984. Prevalence of equine *Sarcocystis* in British horses and a comparison of two detection methods. Vet. Rec. 115, 265–267.
- Erber, M., Geisel, O., 1981. Prevalence and development of two *Sarcocystis* spp. in the horse. Z. Parasitenkd. 65, 283–291 (author's transl).
- Fayer, R., Hounsel, C., Giles, R.C., 1983. Chronic illness in a *Sarcocystis* infected pony. Vet. Rec. 113, 216–217.
- Fenger, C.K., Granstrom, D.E., Langemeier, J.L., Stamper, S., Donahue, J.M., Patterson, J.S., Gajadhar, A.A., Marteniuk, J.V., Xiaomin, Z., Dubey, J.P., 1995. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. J. Parasitol. 81, 916–919.
- Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B., 2002. Prevalence of *Sarcocystis* infection in horses in Mongolia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 33, 718–719.
- Granstrom, D.E., Dubey, J.P., Davis, S.W., Fayer, R., Fox, J.C., Poonacha, K.B., Giles, R.C., Comer, P.F., 1993. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 88–90.
- Gunn, H.M., Fraher, J.P., 1992. Incidence of sarcocysts in skeletal muscles of horses. Vet. Parasitol. 42, 33–40.
- Hoane, J.S., Morrow, J.K., Saville, W.J., Dubey, J.P., Granstrom, D.E., Howe, D.K., 2005. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12, 1050–1056.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1997. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: a complementary system to *Toxoplasma gondii*. Methods Enzymol. 13, 123–133.
- Mullaney, T., Murphy, A.J., Kiupel, M., Bell, J.A., Rossano, M.G., Mansfield, L.S., 2005. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. Vet. Parasitol. 133, 27–36.
- Pitel, P.H., Lindsay, D.S., Caure, S., Romand, S., Pronost, S., Gargala, G., Mitchell, S.M., Hary, C., Thulliez, P., Fortier, G., Ballet, J.J., 2003. Reactivity against *Sarcocystis neurona* and *Neospora* by serum antibodies in healthy French horses from two farms with previous equine protozoal myeloencephalitis-like cases. Vet. Parasitol. 111, 1–7.
- Pitel, P.H., Pronost, S., Gargala, G., Anrioud, D., Toquet, M.P., Foucher, N., Collobert-Laugier, C., Fortier, G., Ballet, J.J., 2002. Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. Int. J. Parasitol. 32, 481–485.
- Rossano, M.G., Mansfield, L.S., Kaneene, J.B., Murphy, A.J., Brown, C.M., Schott 2nd, H.C., Fox, J.C., 2000. Improvement of Western blot test specificity for detecting equine serum antibodies to *Sarcocystis neurona*. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 28–32.
- Saville, W.J., Dubey, J.P., Oglesbee, M.J., Sofaly, C.D., Marsh, A.E., Elitsur, E., Vianna, M.C., Lindsay, D.S., Reed, S.M., 2004. Experimental infection of ponies with *Sarcocystis fayeri* and differentiation from *Sarcocystis neurona* infections in horses. J. Parasitol. 90, 1487–1491.
- Woldemeskel, M., Gebreab, F., 1996. Prevalence of sarcocysts in livestock of northwest Ethiopia. Zentralbl. Veterinarmed. B 43, 55–58.
- Wright, P.F., Nilsson, E., Van Rooij, E.M., Lelenta, M., Jeggo, M.H., 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. Rev. Sci. Technol. 12, 435–450.
- Yeagan, M.R., Howe, D.K., 2011. Improved detection of equine antibodies against *Sarcocystis neurona* using polyvalent ELISAs based on the parasite SnSAG surface antigens. Vet. Parasitol. 176, 16–22.

4. Resumen y Discusión



La información de que dispone sobre los parasitismos en caballos es limitada y sesgada hacia las infecciones por nematodos gastrointestinales estrangilados. Con objeto de solucionar esta situación en el Noroeste de España, se planteó un **primer ensayo** para conocer con exactitud **las principales helmintosis parasitarias del ganado equino en una zona con clima oceánico (NO España)**. El análisis de muestras fecales de 418 caballos, utilizando técnicas copromicroscópicas (flotación, sedimentación, migración larvaria y coprocultivos) mostró que el 1% tenían cestodos (*Anoplocephala perfoliata*), 11% ascáridos (*Parascaris equorum*), 89% nematodos gastrointestinales (*Trichonema*, *Gyalocephalus* spp., *Strongylus* y *Triodontophorus*) y 3% oxiúridos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diferentes países como Bucknell et al. (1995) en Australia, Romaniuk et al. (2004) en Polonia y Pereira y Vianna (2006) en Brasil.

La prevalencia de cestodosis coincide con los datos observados en Alemania (Epe et al., 2004) y EEUU (Martin-Downum et al., 2001), quienes destacaron que el 1'4-5% de los caballos eliminan huevos en las heces. Por el contrario, Slocombe et al. (2007) estudiaron mediante coprología la prevalencia de parasitación por cestodos en caballos de Canadá, Francia, Alemania y Nueva Zelanda y encontraron cifras más altas (51%, 34%, 13% y 26%). En la región centro de España, Meana et al. (2005) hallaron cestodos en el 20 % de los caballos sacrificados en matadero, muy similar a lo detectado por necropsia en Australia (Mfitilodze y Hutchinson, 1990) y Estados Unidos (Marciondo et al., 2006). Estos resultados inciden en la problemática del diagnóstico de algunas parasitosis cuando se emplean pruebas copromicroscópicas.

Teniendo en cuenta la **edad** de los caballos, se apreció influencia en la prevalencia de parascariosis, obteniéndose los valores más elevados en los potros menores de 3 años, de acuerdo con Mfitilodze y Hutchinson (1989) Bucknell et al. (1995). La prevalencia de estrangilosis fue significativamente superior en caballos menores de 10 años, posiblemente debido a la inmunidad natural adquirida con el paso del tiempo (Klei y Chapman, 1999). En un estudio coprológico desarrollado en Alemania, von Samson-Himmelstjerna et al. (2007) demostraron que los potros presentaban las prevalencias más altas de parasitación por nematodos de la familia *Strongylidae* y ascáridos. Lyons et al. (2006), en Estados Unidos, comprobaron que la prevalencia de eliminación de huevos de ascáridos era del 46% en potros y del 10% en caballos de más de 3 años.

El mantenimiento de los caballos Pura Raza Galega (PRG) en condiciones extensivas (montes), con un manejo inapropiado, parece ser la principal causa de la mayor prevalencia de parascariosis y estrongilosis, al contrario de lo observado para los ejemplares de Pura Raza Español. Otra posible interpretación pasaría por considerar el valor económico de los caballos, que favorece la administración de cuidados adecuados (alimentación, desparasitación) en los Caballos de Deporte Español (CDE). Sin embargo, esta hipótesis se pone en duda al observar que los Pura Sangre Inglés y los PRE alcanzaron prevalencias elevadas de nematodosis gastrointestinales.

Las yeguas mostraron mayores porcentajes de infección por ascáridos y estrongilados, en coincidencia con estudios previos (Fikru *et al.*, 2005). Es interesante destacar que los estudios basados en el análisis de la eliminación de huevos de parásitos a través de las heces de los equinos puede presentar una dinámica estacional (Kuzmina *et al.*, 2006).

Con el propósito de determinar la utilidad de una prueba ELISA con antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus* spp., se diseñó un **segundo estudio** que consistió en establecer la cronobiología de este parásito, y su distribución entre caballos de Galicia. Para conseguir el primer objetivo, con periodicidad mensual se tomaron muestras de sangre de un rebaño de 25 caballos, al tiempo que se examinaba el pelaje de los animales para determinar la posible presencia de huevos, y las heces para comprobar si había larvas 3.

Las muestras de suero se enfrentaron a los productos de excreción/secreción de larvas 2 de *G. intestinalis* y de *G. nasalis*. Diferentes investigaciones han señalado que estas 2 especies son las de mayor prevalencia en équidos (Coles y Pearson, 2000; Lyon *et al.*, 2000; Otranto *et al.*, 2005), por lo que la posibilidad de infestaciones mixtas en un mismo caballo es elevada. El punto de corte se calculó con sueros de caballos que al sacrificio no presentaban larvas de los parásitos, determinándose como la media de las absorbancias + 2 desviaciones estándar.

El análisis de 398 sueros de caballos para estudiar la distribución de la seroprevalencia de esta miasis (segundo objetivo) mostró que el 50% era positivos. En caballos sacrificados en un matadero de Suiza, Brocard y Pfister (1991) comprobaron que el 64% tenían larvas de *G.*

intestinalis en el estómago, y que esta era la única especie presente. No observaron diferencias con la edad de los caballos. En Bélgica, Agneessens *et al.* (1998) encontraron larvas de *G. intestinalis* en el 58% de los caballos sacrificados, y no obtuvieron diferencias con la edad, lo que coincide con los resultados de Gökçen *et al.* (2008) en caballos árabes de Turquía.

En invierno se detectaron los porcentajes más elevados de presencia de anticuerpos frente a *Gasterophilus* (100%) y los más bajos en junio-julio (3-9%). Se demostraron variaciones estacionales de la respuesta inmunitaria humoral, con una disminución de enero a julio, e incremento de agosto a enero. Estos resultados se asociaron con la migración de los estadios de *Gasterophilus* en los equinos, estableciéndose que desde principios de invierno a finales de verano tiene lugar una reducción del estímulo antigénico, que denota la presencia de larvas 3 (con menor inmunogenicidad) o incluso la ausencia de estadios larvarios (Roelfstra *et al.*, 2009). Esta hipótesis se corroboró con la observación de larvas 3 en las heces de los equinos entre marzo y mayo, y de huevos en el pelo de los caballos desde junio a septiembre. Una vez que las larvas 3 maduran, abandona el tracto gastrointestinal y son eliminadas en las heces, y una vez en el suelo pupan (Cogley y Cogley, 2000).

El incremento de la respuesta anticuerpo de verano a invierno parece reflejar la existencia de un nuevo estímulo antigénico, señalando la ingestión de huevos que contienen larvas 1 en su interior. Se ha demostrado que la oviposición se produce a temperaturas superiores a 15°C, que favorecen el vuelo de las moscas adultas (Sievers y Weber, 2005). Ante estas condiciones, parece razonable asumir que la pupación en la zona de estudio (clima oceánico) concluye a finales de la primavera, y las moscas vuelan durante el verano; esto explicaría el hallazgo de huevos de *Gasterophilus* en el pelo de los caballos de junio a septiembre (Zumpt, 1965).

Una vez en la boca, las larvas 1 se liberan de los huevos y en aproximadamente 1 mes mudan a L2, que se dirigen al estómago e intestino y se convierten en L3, permaneciendo inmóviles durante 8-10 meses (Duponte y Larish, 2003). Las larvas 2 presentan mayor antigenicidad que las L3, probablemente porque se produce la liberación de productos que favorecen su migración (Roelfstra *et al.*, 2009), y que podría explicar el aumento de la respuesta anticuerpo de agosto a enero. Es importante tener en cuenta que las L3 cuentan con ganchos alrededor del aparato

bucal y espinas, que pueden provocar hemorragias, gastritis crónica, ulceraciones... que estimularían la presentación de antígeno al sistema inmunitario. En base a los resultados obtenidos, se sugieren la aplicación de 2 tratamientos antiparasitarios, uno curativo en verano para eliminar las L1, y otro preventivo en otoño para suprimir las L2.

Del análisis conjunto de los datos recabados se concluye que la aplicación del ELISA con antígenos de larvas 2 de *Gasterophilus* proporciona una herramienta muy útil para la identificación de caballos infestados. Asimismo, resulta muy útil para definir la cronobiología de esta miasis, y fijar los momentos más adecuados para la administración de tratamientos antiparasitarios.

El conocimiento de la interacción parásito/hospedador es clave para implementar estrategias eficaces en la lucha frente a estos agentes patógenos. Los caballos en pastoreo presentan un riesgo importante de infección por ciatostominos debido a la posibilidad de ingerir larvas 3 de estos nematodos junto con el alimento. Una vez en el intestino delgado, las larvas penetran la mucosa y dan lugar a la formación de un quiste fibroblástico mural, donde se transforman en larvas 4 (L4) (Eysker et al., 1984). Después de eclosionar, las L4 se dirigen al lumen intestinal, mudan a L5 y finalmente a formas adultas, que eliminan huevos con las heces, haciendo posible su detección (Francisco et al., 2009).

El periodo de prepatencia o de aparición de huevos en la materia fecal es superior a 12 semanas, de forma que la técnica copromicroscópica de flotación aportaría información acerca de un estado patente de la infección, en el que las alteraciones patológicas más severas ya han tenido lugar (Osterman et al., 2005).

Para intentar solucionar esta situación, se llevó a cabo una **tercera actividad** en la que se prepararon **antígenos de excreción/secreción de una mezcla de L3 de ciatostominos** (*Cyathostomum* y *Poteriostomum*). Posteriormente, se purificaron en un sistema de cromatografía líquida a baja presión (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*), resolviéndose 3 complejos proteicos de 51, 29, y 15 kDa (P1-P3). La evaluación de la utilidad potencial de estos antígenos se realizó con un ELISA y sueros de 2 grupos de caballos infectados de forma natural.

Mediante la elaboración de las curvas ROC tras la comparación de los resultados obtenidos por flotación y ELISA, se estableció el punto de corte, 0'485, 0'4955 y 0'481, respectivamente; de igual modo, se obtuvieron valores superiores a 0'9 para el AUC (área bajo la curva); los porcentajes de sensibilidad y especificidad fueron mayores de 90%.

Se comprobó que la respuesta IgG frente a los 3 picos antigénicos aumentaba de forma significativa 4 semanas antes de la aparición de los huevos de *ciatostominos* en heces. Además, se estableció una correlación entre el recuento de huevos y los valores de anticuerpos frente a P3. En investigaciones previas se demostró que en ponies los anticuerpos aumentaban a las 5-7 semanas después de la infección experimental, empleando 2 antígenos de 25 y 20 kDa de los productos somáticos de L3 de *ciatostominos*; también se observó que el número de L3 y las absorbancias frente a la proteína de 25 kDa estaban correlacionados (Dowdall *et al.*, 2003, 2004). La purificación de péptidos de diferentes peso molecular podría deberse al origen de los productos, somáticos en este último caso, y de excreción/secreción en el nuestro.

Un aspecto a destacar en la infección por *ciatostominos* es que el desenquistamiento de las L4 de la pared intestinal provoca la liberación de productos de excreción/secreción (Reinemeyer y Nielsen, 2009). Esta podría ser la explicación al incremento en los valores de anticuerpos detectados 4 semanas antes de la aparición de los huevos en las heces.

Estos resultados señalan la utilidad de la purificación de antígenos de *ciatostominos* por cromatografía líquida, para la obtención de productos susceptibles de utilización en pruebas inmunoenzimáticas que hagan posible el diagnóstico precoz de infección en caballos. Esta información es particularmente interesante si se tiene en cuenta que las *ciatostominosis* equinas son la diana principal de los programas para el control parasitario en estos animales (Ramsey *et al.*, 2004).

Bajo la denominación de **sarcocistosis equina** se describen dos tipos de cuadros clínicos, uno caracterizado por el desarrollo de una enfermedad que se ajusta en todos sus términos a los de una sarcocistosis típica, con formación de quistes musculares, denominada sarcocistosis

muscular, y otro caracterizado por el desarrollo de una enfermedad de naturaleza neurológica, sin formación de quistes musculares, denominada sarcocistosis nerviosa.

Los parásitos del género *Sarcocystis* spp. (Subclase Coccidia) pueden infectar a un amplio rango de mamíferos (Woldemeskel *et al.*, 1996). Se necesitan dos hospedadores para completar el ciclo biológico, el hospedador definitivo (un carnívoro, generalmente el perro) en el que se desarrolla la fase sexual y que elimina ooquistes, y un hospedador intermediario (por ejemplo los caballos) donde la fase asexual tiene lugar con la producción de quistes de taquizoítos y bradizoítos (Bonesi *et al.*, 1999).

Al igual que sucede en otras especies animales, los équidos actúan como hospedadores intermediarios de varias especies del protozoo *Sarcocystis* spp. (Dubey *et al.*, 1989). La infección por *Sarcocystis* y la formación de quistes suele cursar de forma subclínica. Por esta razón, el examen de músculos en la necropsia de los caballos puede suponer una subestimación de la prevalencia real de esta parasitosis (Gunn y Fraher, 1992).

En el **cuarto ensayo** se realizó una encuesta serológica en 138 caballos aparentemente sanos de Galicia; se aplicó la inmunoelectrotransferencia con antígenos obtenidos de merozoítos de *S. neurona*. La seroprevalencia de sarcocistosis fue superior a 80%, pese a que habría que contemplar la posibilidad de inmunidad cruzada con antígenos de otros coccidios (*Toxoplasma gondii*, *Besnoitia* spp.), reducida según estudios previos (Howe y Sibley, 1997). El reconocimiento de 2 proteínas de 30 y 16 kDa parece abundar en la exposición de los caballos a especies de *Sarcocystis* diferentes de *S. neurona*.

Con el propósito de participar en competiciones deportivas, o simplemente objeto de transacciones económicas, se incrementan las posibilidades de viajar y de transportar caballos entre diferentes países. El continente americano es el único lugar que alberga a la zarigüeya (*Didelphis* spp.), hospedador definitivo de *S. neurona* (Fenger *et al.*, 1995; Dubey *et al.*, 2001), aspecto que limita geográficamente su presencia. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos frente a *S. neurona* en caballos sanos y con signos clínicos neurológicos de Francia (Pitel *et al.*, 2002, 2003). De acuerdo a estos resultados, se analizó mediante ELISA la

respuesta inmunitaria humoral de los caballos de Galicia frente a varias proteínas recombinantes de la superficie de *S. neurona* (rSnSAG2 y rSnSAG4/3), encontrándose que menos del 4% de las 138 muestras eran positivas. Profundizando en este sentido, se testaron 246 sueros más empleando rSnSAG2-ELISA, y la seroprevalencia no alcanzó el 3%. Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado en caballos del hemisferio Este. La mayoría de los estudios de seroprevalencia de este parásito han sido desarrollados solamente en el norte y sur de América. En general, se ha detectado una elevada seroprevalencia frente a *S. neurona* en caballos de Estados Unidos (30-50%), Brasil (35-69´6%), y Argentina (35´5%) según lo descrito por MacKay, 1997; Dubey et al., 1999a; Hoane et al., 2006 y Dubey et al., 1999b. Hoane et al. (2006) atribuyen la variación de seroprevalencia en las diferentes regiones del norte de América al clima y la densidad de los hospedadores de *S. neurona*, y en particular al hospedador definitivo.

Es interesante remarcar la seropositividad de 1 de las muestras frente a *S. neurona*. Se trataba de una yegua de 7 años proveniente de Irlanda, que en principio no estuvo expuesta a *S. neurona* (no estuvo en el continente americano), aunque se ha sugerido la ingestión de comida contaminada originariamente en EEUU como causa probable (Pitel et al., 2003). Cabría elucubrar con la posibilidad de que esta especie haya encontrado en Europa un hospedador definitivo diferente de la zarigüeya.

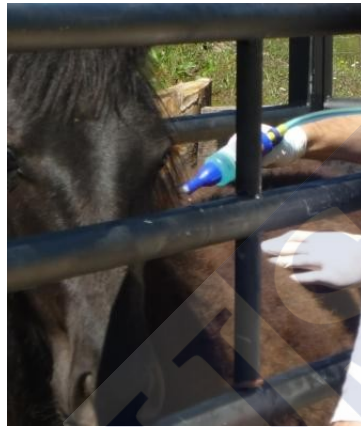
En caballos Pura Sangre nacidos en la India, Brown et al. (2006) observaron una seroprevalencia del 0´8%, por un 42% en los animales nacidos en Norteamérica, y el 100% en los procedentes de Francia. Estos datos indican que los anticuerpos frente a *S. neurona* pueden ser detectados varios años después de su llegada de áreas endémicas, lo que puede atribuirse a los largos periodos de persistencia de los anticuerpos, a la infección crónica y consecuente producción continua de anticuerpos, o a ambos. Se sabe, por ejemplo que los anticuerpos calostrales de *S. neurona* en los équidos permanecen hasta los 4´2 meses de edad (Cook et al., 2001).

La inmunoelectrotransferencia se ha empleado como prueba definitiva para el serodiagnóstico de *S. neurona* en varios animales, y se considera altamente específica (Elsheikha et al., 2007; Dubey et al., 2010). Se ha demostrado que las infecciones por *S. fayeri* y *S. neurona* en caballos pueden distinguirse mediante esta técnica, haciendo posible detectar la presencia de anticuerpos

frente a *S. neurona* en suero, hecho confirmado mediante examen histológico y observación microscópica de los quistes de ambas especies, que presentan diferencias estructurales (Saville *et al.*, 2004).

El análisis colectivo de todos los datos recabados revela que en Galicia los caballos tienen un elevado riesgo de exposición a *Sarcocystis* spp. La aplicación de un ELISA con antígenos recombinantes hace posible diferenciar específicamente si ha habido exposición a *S. neurona* (Hoane *et al.*, 2005; Yeargan y Howe, 2011).





5. Conclusiones



De los resultados obtenidos en el presente estudio hemos llegado a las siguientes

CONCLUSIONES:

1ª.- Los principales parasitismos digestivos en caballos de Galicia están provocados por nematodos gastrointestinales (*Parascaris equorum*, estrongilados y oxiúridos) y gasterófilos.

2ª.- El análisis de la respuesta inmunitaria frente a antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Gasterophilus* spp. resulta de notable interés para el diagnóstico de infestaciones en equinos, y contribuye al conocimiento de la cronobiología de esta miasis.

3ª.- Se sugiere la administración de dos tratamientos antiparasitarios para el control de la gasterofilosis equina, uno curativo en verano y otro preventivo en otoño.

4ª.- La cromatografía líquida a baja presión hace posible la purificación de antígenos de excreción/secreción de larvas 3 de ciatostominos que favorecen el diagnóstico precoz de caballos infectados de forma natural.

5ª.- En Galicia los caballos tienen un elevado riesgo de exposición a *Sarcocystis* spp. La aplicación de un ELISA con antígenos recombinantes hace posible diferenciar específicamente si ha habido exposición a *S. neurona*.

6ª.- Los procedimientos inmunoenzimáticos constituyen una herramienta fundamental para confirmar o descartar parasitismos equinos en los que no aparecen huevos en las heces, o lo hacen después de periodos de tiempo muy prolongados.





6. Bibliografía



- ABBOTT, J.B., BARRETT, E.J. (2008). The problem of diagnosing tapeworm infections in horses. **Equine Vet J.**, **40**: 5-6.
- AGNEESSENS, J., ENGELEN, S., DEBEVER, P., VERCRUYSSSE, J. (1998). *Gasterophilus intestinalis* infections in horses in Belgium. **Vet Parasitol.**, **77**: 199-204.
- ARIAS, M.S., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J.L., PIÑEIRO, P., FRANCISCO, R., CAZAPAL-MONTEIRO, C., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., ROMASANTA, A., PAZ-SILVA, A. (2011). **Parasitic diseases in livestock under different farming practices: possibilities for their control**. En: Livestock: rearing, farming practices and diseases. M. Tariq Javed (Ed.). Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- ARIAS, M., PIÑEIRO, P., HILLYER, G.V., FRANCISCO, I., CAZAPAL-MONTEIRO, C., SUÁREZ, J.L., MORRONGO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2012b). Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. **Parasitol Res.**, **110**: 1001-1007.
- ARIAS, M., YEARGAN, M., FRANCISCO, I., DANGOUDOUBIYAM, S., BECERRA, P., FRANCISCO, R.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., HOWE, D.K. (2012a). Exposure to *Sarcocystis* spp. in horses from Spain determined by Western blot analysis using *Sarcocystis neurona* merozoites as heterologous antigen. **Vet Parasitol.**, **185**: 301-304.
- ARIAS, M.S., MIGUÉLEZ, S., CAZAPAL-MONTEIRO, C., PIÑEIRO, P., ORTEGA, E., RODRÍGUEZ, M.I., CORTIÑAS, F.J., SUÁREZ, J., POVEDA, L., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2012c). La dicroceliosis equina. Su diagnóstico valorando la respuesta inmunitaria. **Ecuestre**, pp. 94-96.
- BANEYX, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotech.**, **10**: 411-421.
- BARRETT, E.J., BLAIR, C.W., FARLAM, J., PROUDMAN, C.J. (2005). Postdosing colic and diarrhoea in horses with serological evidence of tapeworm infection. **Vet Rec.**, **156**: 252-253.
- BARRIGA, O.O. (1981). Influence of routine extraction procedures in the composition of *Trichinella spiralis* extracts. **J Parasitol.**, **67**: 120-123.
- BOHÓRQUEZ GONZÁLEZ, A., FERNÁNDEZ PATO, N., MARTÍN HERNÁNDEZ, R., LUZÓN PEÑA, M., MEANA MÁÑEZ, A. (2011). Nuevos cebadores para el diagnóstico molecular de cestodosis equinas. **XII Congreso Ibérico de Parasitología**, Zaragoza, 5-8 julio.

- BONESI, G.L., YAMAMURA, M.H., PEREIRA, A.B.I. (1999). Distribution of *Sarcocystis* in equine muscular tissue. **Brazil J Vet Parasitol.**, **8**: 71-73.
- BOWLES, J., BLAIR, D., McMANUS, D.P. (1995). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. **Parasitology**, **110**: 317-328.
- BROCARD, P., PFISTER, K. (1991). The epidemiology of gasterophilosis of horses in Switzerland. **Schweiz Arch Tierheilkd.** **133**: 409-416.
- BUCKNELL, D.G., GASSER, R.B., BEVERIDGE, I. (1995). The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. **Int J Parasitol.**, **25**: 711-724.
- BURGUEÑO, M.J., GARCÍA-BASTOS, J.L., GONZÁLEZ-BUITRAGO, J.M. (1995). ROC curves in the evaluation of diagnostic tests. **Med Clin (Barc.)**, **104**: 661-670.
- BURTON, A.J., NYDAM, D.V., DEAREN, T.K., MITCHELL, K., BOWMAN, D.D., XIAO, L. (2010). The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. **Vet Parasitol.**, **174**: 139-144.
- BUZZELL, G.R., TARIQ, S., TRAVERSA, D., SCHUSTER, R. (2011). Morphology of the infective larval stage of the equid parasite *Habronema muscae* (Spirurida: Habronematidae), from houseflies (*Musca domestica*). **Parasitol Res.**, **108**: 629-632.
- CHAPMAN, M.R., FRENCH, D.D., KLEI, T.R. (2001). Seasonal transmission of gastrointestinal parasites of equids in Southern Louisiana. **J Parasitol.**, **87**: 1371-1378.
- COHEN, S.N., CHANG, A.C., BOYER, H.W., HELLING, R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA**, **70**: 3240-3244.
- COLES, G.C., PEARSON, G.R. (2000). *Gasterophilus nasalis* infection: prevalence and pathological changes in equids in south-west England. **Vet Rec.** **146**: 222-223.
- COOK, A.G., BUECHNER-MAXWELL, V., MORROW, J.K., WARD, D.L., PARKER, N.A., DASCANIO, J.J., LEY, W.B., COOPER, W. (2001). Interpretation of the detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in the serum of young horses. **Vet Parasitol.** **95**: 187-195.
- DALTON, J.P., BRINDLEY, P.J., KNOX, D.P., BRADY, C.P., HOTEZ, P.J., DONNELLY, S., O'NEILL, S.M., MULCAHY, G., LOUKAS, A. (2003a). Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. **Int J Parasitol.**, **33**: 621-640.
- DALTON, J.P., NEILL, S.O., STACK, C., COLLINS, P., WALSHE, A., SEKIYA, M., DOYLE, S., MULCAHY, G., HOYLE, D., KHAZNADJI, E., MOIRE, N., BRENNAN, G., MOUSLEY, A., KRESHCHENKO,

- N., MAULE, A.G., DONNELLY, S.M. (2003b). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. **Int J Parasitol.**, **33**: 1173-1181.
- DANGOUDUBIYAM, S., OLIVEIRA, J.B., VÍQUEZ, C., GÓMEZ-GARCÍA, A., GONZÁLEZ, O., ROMERO, J.J., KWOK, O.C., DUBEY, J.P., HOWE, D.K. (2011). Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. **J Parasitol.**, **97**: 522-524.
- DAWSON, K. (2003). A non-lethal method for assessment of efficacy of antiparasitics against parasites in horses such as *Anoplocephala perfoliata* and *Gasterophilus intestinalis*. **Vet Parasitol.**, **115**: 67-70.
- DÖPFER, D., KERSSSENS, C.M., MEIJER, Y.G., BOERSEMA, J.H., EYSKER, M. (2004). Shedding consistency of strongyle-type eggs in Dutch boarding horses. **Vet Parasitol.**, **124**: 249-58.
- DOWDALL, S.M.J., MATTHEWS, J.B., MAIR, T., MURPHY, D., LOVE, S., PROUDMAN, C.J. (2002). Antigen-specific IgG (T) responses in natural and experimental cyathostominae infection in horses. **Vet Parasitol.**, **106**: 225-242.
- DOWDALL, S.M., PROUDMAN, C.J., LOVE, S., KLEI, T.R., MATTHEWS, J.B. (2003). Purification and analyses of the specificity of two putative diagnostic antigens for larval cyathostomin infection in horses. **Res Vet Sci.**, **75**: 223-229.
- DOWDALL, S.M., PROUDMAN, C.J., KLEI, T.R., MAIR, T., MATTHEWS, J.B. (2004). Characterisation of IgG(T) serum antibody responses to two larval antigen complexes in horses naturally- or experimentally-infected with cyathostomins. **Int. J. Parasitol.**, **34**: 101-108.
- EL-GHAYSH, A. (1998). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Egyptian donkeys using ELISA. **Vet Parasitol.**, **80**: 71-73.
- ELSENER, J., VILLENEUVE, A. (2011). Does examination of fecal samples 24 hours after cestocide treatment increase the sensitivity of *Anoplocephala* spp. detection in naturally infected horses? **Can Vet J.**, **52**: 158-161.
- EPE, C., COATI, N., SCHNIEDER, T. (2004). Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. **Dtsch Tierarztl Wochenschr.**, **111**: 243-247.

- FERNÁNDEZ-BELLÓN, H., SOLANO-GALLEGO, L., BARDAGÍ, M., ALBEROLA, J., RAMIS, A., FERRER, L. (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Vet Parasitol.**, **135**: 181-185.
- FIKRU, R., RETA, D., TESHALE, S., BIZUNESH, M. (2005). Prevalence of equine gastrointestinal parasites in western highlands of Oromia, Ethiopia. **Bull An Health Prod Afr.**, **53**: 161-166.
- FLEISS, J.L. (2000). Statistical methods for rates and proportions, 2nd edition. New York, Wiley.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, I. (2007). **Análisis de riesgo de infección parasitaria en el caballo gallego. Trabajo de Investigación Tutelado.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, R. (2008). **Parásitos helmintos que afectan al caballo gallego. Memoria de Licenciatura.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO VÁZQUEZ, R. (2009). **Desarrollo de un ELISA con antígenos de excreción/secreción para la detección de estrongilosis equina. Trabajo de Investigación Tutelado.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO, I. (2010). **Epidemiología de los principales parasitismos del caballo en Galicia. Tesis Doctoral.** Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- FRANCISCO, I., ARIAS, M., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., MOCHALES, E., SÁNCHEZ, J.A., SUÁREZ, J.L., MORRONDO, P., URIARTE, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍEZ-BAÑOS, P., PAZ-SILVA, A. (2009). Silvopastoralism and autochthonous equine livestock. Analysis of the infection by endoparasites. **Vet Parasitol.**, **164**: 357-362.
- FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, R., SUÁREZ, J., CAZAPAL, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., MORRONDO, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A. (2011a). Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. **J Equine Vet Sci.**, **31**: 530-535.
- FRANCISCO, R., PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., MIGUÉLEZ, S., SUÁREZ, J., CAZAPAL-MONTEIRO, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2011b). Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. **J Equine Vet Sci.**, **32**: 274-280.

- FRANCISCO, R., PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, F.J., MIGUÉLEZ, S., SUÁREZ, J., CAZAPAL-MONTEIRO, C., SUÁREZ, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2012). Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. **J Equine Vet Sci.**, **32**: 274-280.
- GASPAR, P., ESCRIBANO, M., MESÍAS, F.J., RODRÍGUEZ DE LEDESMA, A., PULIDO, F. (2008). Sheep farms in the Spanish rangelands (dehesas): Typologies according to livestock management and economic indicators. **Small Ruminant Res.**, **74**: 52-63.
- GASSER, R.B., HUNG, G.C., CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I. (2004). Advances in developing molecular-diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. **Mol Cell Probes**, **18**: 3-16.
- GETACHEW, A.M., INNOCENT, G., PROUDMAN, C.J., TRAWFORD, A., FESEHA, G., REID, S.W., FAITH, B., LOVE, S. (2012). Equine cestodosis: a sero-epidemiological study of *Anoplocephala perfoliata* infection in Ethiopia. **Vet Res Commun.**, **36**: 93-98.
- GHAZY, A.A., SHAAPAN, R.M., ABDEL-RAHMAN, E.H. (2007). Comparative serological diagnosis of toxoplasmosis in horses using locally isolated *Toxoplasma gondii*. **Vet Parasitol.**, **145**: 31-36.
- GÖKÇEN, A.; SEVGILI, M.; ALTAŞ, M.G.; CAMKERTEN, I. (2008). Presence of *Gasterophilus* species in Arabian horses in Sanliurfa region. **Türkiye Parazitolo Derg.**, **32**: 337-339.
- GORMAN, T., ABALLAY, J., FREDES, F., SILVA, M., AGUILLÓN, J.C., ALCAÍNO, H.A. (1997). Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. **Int J Parasitol.**, **27**: 1429-1432.
- GUPTA, G.D., LAKRITZ, J., KIM, J.H., KIM, D.Y., KIM, J.K., MARSH, A.E. (2002). Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. **Vet Parasitol.**, **106**: 193-201.
- HANLEY, J.A., MCNEIL, B.J. (1982). The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology**, **143**: 29-36.
- HILLYER, G.V. (1999). **Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis**. En Dalton JP. Fasciolosis. Wallingford, Oxon, UK: CABI Pub. pp. 435-47.
- HOANE, J.S., MORROW, J.K., SAVILLE, W.J., DUBEY, J.P., GRANSTROM, D.E., HOWE, D.K. (2005). Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. **Clin Diagn Lab Immunol.**, **12**: 1050-1056.

- HOANE, J.S., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., RIBEIRO, M.G., BORGES, A.S., YAI, L.E., AGUIAR, D.M., CAVALCANTE, G.T., BONESI, G.L., HOWE, D.K. (2006). Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Vet Parasitol.**, **136**: 155-159.
- HODGKINSON, J. E., LOVE, S., LICHTENFELS, J. R., PALFREMAN, S., RAMSEY, Y. H., MATTHEWS, J. B. (2001). Evaluation of the specificity of five oligoprobes for identification of cyathostomin species from horses. **Int J Parasitol.**, **31**: 197-204.
- HODGKINSON, J.E.; FREEMAN, K.L.; LICHTENFELS, J.R.; PALFREMAN, S.; MATTHEWS, J.B. (2005). Identification of strongyle eggs from antihelmintic treated horses using a PCR-ELISA based on intergenic DNA sequences. **Parasitol Res.**, **95**: 287-292.
- HODGKINSON, J.E. (2006). Molecular diagnosis and equine parasitology. **Vet Parasitol.**, **136**: 109-116.
- HÖGLUND, J., LJUNGSTRÖM, B.L., NILSSON, O., UGGLA, A. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. **Vet Parasitol.**, **59**: 97-106.
- HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. (1997). Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. **Methods**, **13**: 123-133.
- HOWE, D.K., GAJI, R.Y., MROZ-BARRETT, M., GUBBELS, M.J., STRIEPEN, B., STAMPER, S. (2005). *Sarcocystis neurona* merozoites express a family of immunogenic surface antigens that are orthologues of the *Toxoplasma gondii* surface antigens (SAGs) and SAG-related sequences. **Infect Immun.**, **73**: 1023-1033.
- HOWE, D.K., GAJI, R.Y., MARSH, A.E., PATIL, B.A., SAVILLE, W.J., LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., GRANSTROM, D.E. (2008). Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. **Int J Parasitol.**, **38**: 623-631.
- HUANG, X., XUAN, X., VERDIDA, R.A., ZHANG, S., YOKOYAMA, N., XU, L., IGARASHI, I. (2006). Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of *Babesia caballi* and *B. equi* infections in horses. **Clin Vaccine Immunol.**, **13**: 553-555.
- IBARRA, F., MONTENEGRO, N., VERA, Y., BOULARD, CH., QUIROZ, H., FLORES, J., OCHOA, P. (1998). Comparison of three ELISA tests for seroprevalence of bovine fasciolosis. **Vet Parasitol.**, **77**: 229-236.

- IONITA, M., HOWE, D.K., LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., KAPLAN, R.M., MITREA, I.L., YEARGAN, M. (2010). Use of a reverse line blot assay to survey small strongyle (Strongylida: Cyathostominae) populations in horses before and after treatment with ivermectin. **Vet Parasitol.**, **168**: 332-337.
- JAKUBEK, E.B., LUNDÉN, A., UGGLA, A. (2006). Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. infections in Swedish horses. **Vet Parasitol.**, **138**: 194-199.
- JENICEK, M., CLEROUX, R. (1987). **Epidemiología, principios, técnicas, aplicaciones**. Barcelona: Salvat Editores S.A., pp. 307-328.
- JENSEN, A.L., POULSEN, J.S. (1992). Evaluation of diagnostic tests using relative operating characteristic (ROC) curves and the differential positive rate. An example using the total serum bile acid concentration and the alanine aminotransferase activity in the diagnosis of canine hepatobiliary diseases. **Zentralbl Veterinarmed A.**, **39**: 656-668.
- KANIA, S.A., REINEMEYER, C.R. (2005). *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. **Vet Parasitol.**, **127**: 115-119.
- KARA, M. (1996). **Antibody responses to equine cyathostome infections. A Thesis**. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, pp 1-51.
- KJAER, L.N., LUNGHOLT, M.M., NIELSEN, M.K., OLSEN, S.N., MADDOX-HYTTEL, C. (2007). Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. **Equine Vet J.**, **39**: 529-533.
- KLEI, T.R. (2000). Equine immunity to parasites. **Vet Clin North Am Eq Pract.**, **16**: 69-78.
- KLEI, T.R., CHAPMAN, M.R. (1999). Immunity in equine cyathostome infections. **Vet Parasitol.**, **85**: 123-133.
- KNOTTNERUS, J.A., VAN WEEL, C., MURIS, JWM. (2002). Evaluation of diagnostic procedures. **Education and debate**, **324**: 477-480.
- KORNAŚ, S., CABARET, J., SKALSKA, M., NOWOSAD, B. (2010). Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. **Vet Parasitol.**, **174**: 285-91.
- KOUAM, M.K., DIAKOU, A., KANZOURA, V., PAPADOPOULOS, E., GAJADHAR, A.A., THEODOROPOULOS, G. (2010). A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Vet Parasitol.**, **170**: 170-175.

- KRIEG, U., WALTER, P., JOHNSON, A.E. (1986). Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 8604-8609.
- KUZMINA, T.A., KUZMIN, Y.I., KHARCHENKO, V.A. (2006). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. **Vet Parasitol.**, **141**: 264-272.
- LEHNER, R.P., SEWELL, M.M.H. (1980). A study of the antigens produced by adult *Fasciola hepatica* maintenance *in vitro*. **Parasite Immunol.**, **2**: 99-109.
- LEVEY, S., JENNINGS, E.R. (1950). The use of control charts in the clinical laboratory. **Am J Clin Pathol.**, **20**: 1059-1066.
- LOVE, S., MURPHY, D., MELLOR D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infections. **Vet Parasitol.**, **85**: 115-122.
- LYONS, E.T., TOLLIVER, S.C., COLLINS, S.S. (2006). Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966. **Parasitol Res.**, **99**: 114-118.
- MADEIRA DE CARVALHO, L.M., AFONSO-ROQUE, M.M., FAZENDEIRO, M.I. (2003). Morfotipos de L3 do género *Cyathostomum sensu lato* (Nematoda: Strongyloidea) – Aplicações no estudo do parasitismo por ciatostomíneos em equinos. **Acta Parasitol. Port.**, pp. 2.
- MADEIRA DE CARVALHO, L.M., GOMES, L., CERNEA, M., CERNEA, C., SANTOS, C.A., BERNARDES, N., ROSÁRIO, M.A., SOARES, M. J., FAZENDEIRO, I. (2007). Parasitismo gastrointestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados. **Rev. Port. Ciências Vet.**, **102**: 225-231.
- MADEIRA DE CARVALHO, L.M., AFONSO-ROQUE, M.M., CARVALHO-VARELA, M. (1999). Seasonal pattern of a population of horse strongyles in Portugal. **17th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology**. 15th-19th August, Copenhagen, Denmark.
- MARÍN, M.S. (1992). **Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario. Tesis Doctoral**. Departamento de Biología Funcional, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo.
- MARÍN, M.S., PRIETO, M., CARMENES, R., BOGA, A., CASAIS, R., MARTIN, M., PARRA, F. (1993). Fasciolosis bovina: Revisión de aspectos de la enfermedad y métodos de diagnóstico. **Mundo Ganadero**, **9**: 76-81.

- MARTIN-DOWNUM, K., YAZWINSKI, T., TUCKER, C., FINCHER, M., RALPH, J., HAMILTON, J. (2001). Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. **Vet Parasitol.**, **101**: 75-79.
- MATTHEWS, A.G., MORRIS, J.R. (1995). Cyathostomiasis in horses. **Vet Rec.**, **136**: 52.
- McWILLIAM, H.E., NISBET, A.J., DOWDALL, S.M., HODGKINSON, J.E., MATTHEWS, J.B. (2010). Identification and characterisation of an immunodiagnostic marker for cyathostomin developing stage larvae. **Int J Parasitol.**, **40**: 265-275.
- MEANA, A., PATO, N., MARTÍN, R., MATEOS, A., PÉREZ GARCÍA, J., LUZÓN, M. (2005). Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: Infection pattern and population dynamics. **Vet Parasitol.**, **130**: 233-240.
- MEZO, M., GONZÁLEZ-WARLETA, M., UBEIRA, F.M. (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. **J Parasitol.**, **93**: 65-72.
- MFITILODZE, M.W., HUTCHINSON, G.W. (1990). Prevalence and abundance of equine strongyles (Nematoda: Strongyloidea) in tropical Australia. **J Parasitol.**, **76**: 487-494.
- MFITILODZE, M.W.; HUTCHINSON, G.W. (1989). Prevalence and intensity of non-strongyle intestinal parasites of horses in northern Queensland. **Aust Vet J.**, **66**: 23-26.
- MILILLO, P., TRAVERSA, D., ELIA, G., OTRANTO, D. (2010). Analysis of somatic and salivary gland antigens of third stage larvae of *Rhinoestrus* spp. (Diptera, Oestridae). *Exp Parasitol.*, **124**: 361-364.
- MILLER, H.R.P. (1990). Respuesta inmunitaria contra el parasitismo interno. **OIE Sci Tech Rev**, **9**: 331-334.
- MORGAN, E.R., HETZEL, N., POVAH, C., COLES, G.C. (2005). Prevalence and diagnosis of parasites of the stomach and small intestine in horses in south-west England. **Vet Rec.**, **156**: 597-600.
- MULA, P., PILO, C., SOLINAS, C., PIPIA, A.P., VARCASIA, A., FRANCISCO, I., ARIAS, M.S., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., MORRONGO, P., DÍEZ-BAÑOS, P., SCALA, A. (2013). Epidemiology, chronobiology and taxonomic updates of *Rhinoestrus* spp. infestation in horses of Sardinia Isle, Western Mediterranean (Italy). *Vet Parasitol.*, **192**: 240-246.
- MUÑOZ, E., ARGÜELLES, D., ARESTE, L., MIGUEL, L.S., PRADES, M. (2008). Retrospective analysis of exploratory laparotomies in 192 Andalusian horses and 276 horses of other breeds. **Vet Rec.**, **162**: 303-306.

- NANSEN, P., ANDERSEN, S., HARMER, E. (1974). The course of an experimental liver fluke infection in the pig. **Acta Vet Scand.**, **15**: 138-140.
- NIELSEN, M.K., PETERSON, D.S., MONRAD, J., THAMSBORG, S.M., OLSEN, S.N., KAPLAN, R.M. (2008). Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. **Int J Parasitol.**, **38**: 443-453.
- OLDHAM, G. (1983). Antibodies to *Fasciola hepatica* antigens during experimental infections in cattle measured by ELISA. **Vet Parasitol.**, **13**: 151-158.
- OSTERMAN LIND, E., UGGLA, A., WALLER, P., HÖGLUND, J. (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. **Vet Parasitol.**, **128**: 261-269.
- PACKHAM, A.E., CONRAD, P.A., WILSON, W.D., JEANES, L.V., SVERLOW, K.W., GARDNER, I.A., DAFT, B.M., MARSH, A.E., BLAGBURN, B.L., FERRARO, G.L., BARR, B.C. (2002). Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. **J Parasitol.**, **88**: 1239-1246.
- PAZ-SILVA, A., PEDREIRA, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J.L., DÍAZ, P., PANADERO, R., DÍEZ, P., MORRONDO, P. (2002). Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. **Parasitol Res.**, **88**: 568-573.
- PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J.L., PEDREIRA, J., ARIAS, M.S., LÓPEZ, C., PANADERO, R., DÍAZ, P., DÍEZ, P., MORRONDO, P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. **Parasitol Res.**, **91**: 328-331.
- PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, R., RODRÍGUEZ, I., FRANCISCO, I., CAZAPAL-MONTEIRO, C.F., ARIAS, M.S., SUÁREZ, J.L., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2011a). Isolation of potentially useful antigens from cyathostomin third-stage larvae by using a fast protein liquid chromatography one-step method. **Clin Vac Immunol.**, **18**: 1462-1466.
- PAZ-SILVA, A., FRANCISCO, I., VALERO-COSS, R.O., CORTIÑAS, F.J., SÁNCHEZ, J.A., FRANCISCO, R., ARIAS, M., SUÁREZ, J.L., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DE GIVES, P.M. (2011b). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. **Vet Parasitol.**, **179**: 277-282.
- PFISTER, K. (1990). Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. **Rev Sci Tech.**, **9**: 511-518.

- PITEL, P.H., PRONOST, S., GARGALA, G., ANRIOUD, D., TOQUET, M.P., FOUCHER, N., COLLOBERT-LAUGIER, C., FORTIER, G., BALLE, J.J. (2002). Detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in French horses with neurological signs. **Int J Parasitol.** **32**: 481-485.
- PITEL, P.H., ROMAND, S., PRONOST, S., FOUCHER, N., GARGALA, G., MAILLARD, K., THULLIEZ, P., COLLOBERT-LAUGIER, C., TAINURIER, D., FORTIER, G., BALLE, J.J. (2003). Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. **Vet Parasitol.** **118**: 1-6.
- PROUDMAN, C.J., EDWARDS, G.B. (1992). Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. **Vet Rec.** **131**: 71-72.
- PROUDMAN, C.J., TREES, A.J. (1996a). Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. **Vet Parasitol.** **61**: 239-247.
- PROUDMAN, C.J., TREES, A.J. (1996b). Correlation of antigen-specific IgG and IgG(T) with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. **Paras Immunol.** **18**: 499-506.
- PROUDMAN, C.J., TREES, A.J. (1999). Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses. **Parasitol Today.** **15**: 156-159.
- PROUDMAN, C.J., MATTHEWS, J.B. (2000). Control of intestinal parasites in horses. **Eq Pract. (Feb)**: 90-97.
- REINEMEYER, C.R., NIELSEN, M.K. (2009). Parasitism and colic. **Vet Clin North Am Equine Pract.** **25**: 233-245.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, J., HILLYER, G.V. (1991). Teaching Molecular Parasitology: DNA cloning and analysis. **Res Rev Parasitol.** **511**: 175-185.
- ROMANIUK, K., RESZKA, K., LASOTA, E. (2004). Influence of animal breeding manner on the occurrence of internal parasites. **Wiad Parazytol.** **50**: 647-651.
- ROMASANTA, A., ROMERO, J.L., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., LÓPEZ, C., SUÁREZ, J.L., DÍAZ, P., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONGO, P., PAZ-SILVA, A. (2003). Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. **Immunol Invest.** **32**: 131-142.
- SACKETT, P.R., BURRIS, L.R., CALLAHAN, C. (1989). Integrity testing for personnel selection: An update. **Personnel Psychology**, **37**: 491-529.

- SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (1994). **Fasciolosis bovina: Estudio comparado de la respuesta inmunológica por ELISA frente a antígeno de excreción-secreción y el diagnóstico directo. Tesis Doctoral.** Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., SUÁREZ, J., PANADERO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). **Vet Parasitol.**, **93**: 39-46.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., SUÁREZ, J.L., PANADERO, R., PEDREIRA, J., LÓPEZ, C., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). **Vet Res Commun.**, **26**: 361-370.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., ROMERO, J.L., SUÁREZ, J.L., PEDREIRA, J., DÍAZ, P., ARIAS, M., PAZ-SILVA, A., PANADERO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., SCALA, A. (2005). Comparison of Oestrus ovis metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myasis oestrosis by immunoenzymatic probes. **Immunol Invest.**, **34**: 91-99.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., CORTIÑAS, F.J., FRANCISCO, I., SÁNCHEZ, J.A., MULA, P., CAZAPAL, C., VÁZQUEZ, L., SUÁREZ, J.L., FRANCISCO, R., ARIAS, M.S., DÍEZ-BAÑOS, P., SCALA, A., PAZ-SILVA, A. (2010). A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. **Vet Parasitol.**, **171**: 314-320.
- SANTIAGO, N., HILLYER, G.V. (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. **J Parasitol.**, **74**: 810-818.
- SCHUSTER, R.K., SIVAKUMAR, S., KINNE, J., BABIKER, H., TRAVERSA, D., BUZZELL, G.R. (2010). Cutaneous and pulmonal habronemosis transmitted by *Musca domestica* in a stable in the United Arab Emirates. **Vet Parasitol.**, **174**: 170-174.
- SHEWHART, W.A. (1931). **Economic control of quality of manufactured product.** New York: D. Van Nostrand Company, 501 pp.
- SKOTAREK, S.L., COLWELL, D.D., GOATER, C.P. (2010). Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. **Vet Parasitol.**, **172**: 249-255.
- SLOCOMBE, J.O. (2006). A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. **Vet Parasitol.**, **136**: 127-135.

- SLOCOMBE, J.O., DE GANNES, R.V., LAKE, M.C. (2007). Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. **Vet Parasitol.**, **145**: 371-376.
- SMITH, D.B., DAVERN, K.M., BOARD, P.G., TIU, W.U., GARCÍA, E.G., MITCHELL, G.F. (1986). Mr 26,000 antigens of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. **Proc Natl Acad Sci USA.**, **83**: 8703-8707.
- SOULÉ, C., BOULARD, C., LEVIEUX, D., BARNOUIN, J., PLATEAU, E. (1989). Experimental equine fascioliasis: evolution of serologic, enzymatic and parasitic parameters. **Ann Rech Vet.**, **20**: 295-307.
- STRONG, L. (1992). Avermectins: a review of their impact on insects of cattle dung. **Bull Entomol Res.**, **82**: 265-267.
- TERKAWI, M.A., ALHASAN, H., UENO, A., RATTHANOPHART, J., LUO, Y., CAO, S., KAMYINGKIRD, K., ABOULAILA, M., YOUN-KYOUNG, G., NISHIKAWA, Y., YOKOYAMA, N., XUAN, X., IGARASHI, I. (2012). C-terminal region of 48-kDa rhoptry protein for serological detection of *Babesia caballi* antibodies in horses. **Parasitol Int.**, **61**: 493-496.
- THRUSFIELD, M.V. (2005). **Veterinary Epidemiology**. Tercera edición. Blackwell Science Ltd. a Blackwell Publishing Company. Oxford. UK.
- TRAVERSA, D., FICHI, G., CAMPIGLI, M., RONDOLOTTI, A., IORIO, R., PROUDMAN, C.J., PELLEGRINI, D., PERRUCCI, S. (2008). A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). **Vet Parasitol.**, **152**: 271-277.
- TRAVERSA, D., GIANGASPERO, A., IORIO, R., OTRANTO, D., PAOLETTI, B., GASSER, R.B. (2004). Semi-nested PCR for the specific detection of *Habronema microstoma* or *Habronema muscae* DNA in horse faeces. **Parasitology**, **129**: 733-739.
- TRAVERSA, D., GIANGASPERO, A., IORIO, R., OTRANTO, D., PAOLETTI, B., GASSER, R.B. (2004). Semi-nested PCR for the specific detection of *Habronema microstoma* or *Habronema muscae* DNA in horse faeces. **Parasitology**, **129**: 733-739.
- TRAVERSA, D., IORIO, R., CAPELLI, G., PAOLETTI, B., BARTOLINI, R., OTRANTO, D., GIANGASPERO, A. (2006). Molecular cross-sectional survey of gastric habronemosis in horses. **Vet Parasitol.**, **141**: 285-290.

- TRAVERSA, D., KLEI, T.R., IORIO, R., PAOLETTI, B., LIA, R.P., OTRANTO, D., SPARAGANO, O.A., GIANGASPERO, A. (2007). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome populations in central and southern Italy. **Prev Vet Med.**, **82**: 314-320.
- TROTZ-WILLIAMS, L., PHYSICK-SHEARD, P., MCFARLANE, H., PEARL, D.L., MARTIN, S.W., PEREGRINE, A.S. (2008). Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. **Vet Parasitol.**, **153**: 73-84.
- TRUDGETT, A., ANDERSON, A., HANNA, R.E. (1988). Use of immunosorbent-purified antigens of *Fasciola hepatica* in enzyme immunoassays. **Res Vet Sci.**, **44**: 262-263.
- UTZINGER, J., RINALDI, L., LOHOURIGNON, L.K., ROHNER, F., ZIMMERMANN, M.B., TSCHANNEN, A.B., N'GORAN, E.K., CRINGOLI, G. (2008). FLOTAC: a new sensitive technique for the diagnosis of hookworm infections in humans. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, **102**: 84-90.
- VAN HERWERDEN, L., GASSER, R.B., BLAIR, D. (2000). ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. **Int J Parasitol.**, **30**: 157-169.
- VARGAS, D., DEL PINO, S., GONZÁLEZ, C.G., VIDAL, M. (2001). Implementación de un ensayo ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis equina. **Bol Chil Parasitol.**, **57**: 91-94.
- VIVEROS, N., ARRIAGA, C., BANDA, V., ORTEGA-PIERRES, M.G., YÉPEZ-MULIA, L. (2001). Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. **Parasite**, **8**: S257-S259.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., VON WITZENDORFF, C., SIEVERS, G., SCHNIEDER, T. (2002). Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. **Vet Parasitol.**, **108**: 227-235.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., FRITZEN, B., DEMELER, J., SCHÜRMANN, S., ROHN, K., SCHNIEDER, T., EPE, C. (2007). Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. **Vet Parasitol.**, **144**: 74-80.
- VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. (2012). Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. **Vet Parasitol.** **185**: 2-8.

- WESCOTT, R.B., FARRELL, C.J., SHEN, D.T. (1984). Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Vet Res.**, **45**: 178-179.
- WOO, E.K., HAN, C., JO, S.A., PARK, M.K., KIM, S., KIM, E., PARK, M.H., LEE, J., JO, I. (2007). Morbidity and related factors among elderly people in South Korea: results from the Ansan Geriatric (AGE) cohort study. **BMC Public Health**, **7**: 10.
- YEARGAN, M.R., HOWE, D.K. (2011). Improved detection of equine antibodies against *Sarcocystis neurona* using polyvalent ELISAs based on the parasite SnSAG surface antigens. **Vet Parasitol.**, **176**: 16-22.
- YÉPEZ, M., SÁNCHEZ, J. (1981). *Fasciola hepatica* en un equino de Sanare - Venezuela. **Vet Tropic.**, **6**: 67-68.
- YÉPEZ-MULIA, L., ARRIAGA, C., VIVEROS, N., ADAME, A., BENITEZ, E., ORTEGA-PIERRES, M.G. (1999). Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. **Vet Parasitol.**, **81**: 57-68.
- ZIMMERMAN, G.L., CLARK, C.R. (1986). Separation of parasite antigens by molecular exclusion, anion exchange, and chromatofocusing utilizing FPLC protein fractionation systems. **Vet Parasitol.**, **20**: 217-228.